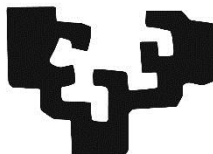


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**Development of a cartilage tissue  
engineering construct based on hASCs  
spheroids differentiated under hypoxia in a  
chitosan/chitin nanocrystals 3D scaffold**

**Verónica Zubillaga Marañón**

Leioa, 2019

Directores:

**Prof. Dra. Ana Isabel Alonso Varona**

**Prof. Dr. Teodoro Palomares Casado**

Este trabajo de tesis doctoral ha sido realizado gracias a la financiación recibida en la convocatoria de ayudas predoctorales de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (PIF2014/46).

*This doctoral thesis work had been carried out thanks to the funding received in the call for predoctoral grants from the University of the Basque Country (UPV/EHU) (PIF2014/46).*

*A mis aïtas*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, la Doctora Ana Alonso y el Doctor Teodoro Palomares, la oportunidad que me dieron de incorporarme a su grupo de investigación, la confianza depositada en mí para llevar a cabo este proyecto, su apoyo y dedicación durante todos estos años.

Al mismo tiempo, quiero expresar mi agradecimiento a la Doctora Susana Fernandes, por su ayuda, palabras de ánimo y por abrirme las puertas tanto de Estocolmo como del *Royal Institute of Technology*.

Gracias a mis compañeras de laboratorio, Patricia Garrido y María Burón por el gran equipo que formamos, por toda la ayuda y tantos buenos momentos juntas. Gracias a Cristina García y María Cordero por su ayuda en mis primeros pasos en el laboratorio. Igualmente, gracias a mis compañeros de departamento por el buen compañerismo, generosidad y gran ayuda.

Gracias a Miguel por las conversaciones tan reconfortantes y por ser luz en el camino.

Gracias a César, Guille y Borja por haber sido mi familia en Estocolmo.

Gracias a mis amigas por estar ahí desde hace tanto tiempo.

Gracias a mis padres, Francis y Begoña y a mi hermana Paula, por ser mi referencia, por su apoyo incondicional y, sobre todo, por creer en mí y en esta tesis.

Y, en especial, gracias Darío.



## ÍNDICE





---

ÍNDICE DE MATERIAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
FIGURES INDEX .....	viii
SUPPLEMENTARY FIGURES INDEX .....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
TABLES INDEX .....	xi
ABREVIATURAS/GLOSSARY .....	xi

## ÍNDICE DE MATERIAS

SUMMARY .....	1
I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	5
II. INTRODUCCIÓN .....	9
II.1 EL CARTÍLAGO .....	11
II.1.1 Componentes celulares.....	12
II.1.2 Matriz extracelular (MEC).....	13
II.1.2.1 Colágeno.....	14
II.1.2.2 Proteoglicanos.....	14
II.1.2.3 Otras moléculas.....	16
II.1.3 Condrogénesis .....	16
II.1.3.1 Superfamilia de los TGF- $\beta$ .....	18
II.1.3.2 Proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) .....	19
II.1.3.3 Factor de crecimiento del tipo insulínico (IGF).....	20
II.1.3.4 Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) .....	21
II.1.4 Tipos de cartílago .....	22
• <i>Cartílago hialino</i> .....	22
• <i>Cartílago elástico</i> .....	23

• <i>Fibrocartilago</i> .....	24
<b>II.2. EL CARTÍLAGO ARTICULAR</b> .....	25
<b>II.3 PATOLOGÍAS DEL CARTÍLAGO ARTICULAR</b> .....	29
<b>II.3.1 Osteoartritis (OA)</b> .....	30
<b>II.3.2 Artritis Reumatoide</b> .....	34
<b>II.3.3 Otras patologías articulares</b> .....	35
<b>II.4 TERAPIAS DIRIGIDAS A LA REGENERACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR</b> .....	36
<b>II.4.1 Inducción de la microfactura</b> .....	36
<b>II.4.2 Implantación de condrocitos autólogos (ICA)</b> .....	37
<b>II.4.3 Injertos osteocondrales autólogos/aloinjertos</b> .....	39
<b>II.4.4 Inoculación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF)</b> .....	40
<b>II.4.5 Ingeniería Tisular (IT) del cartilago</b> .....	41
II.4.5.1 Componente celular .....	42
II.4.5.2 Factores reguladores de la diferenciación condrogénica .....	48
<i>II.4.5.2.1 Formación de agregados tridimensionales (3D)</i> .....	49
<i>II.4.5.2.2 Biodisponibilidad de oxígeno (O<sub>2</sub>)</i> .....	53
<i>II.4.5.2.3 Moléculas reguladoras de la diferenciación condrogénica</i> .....	54
II.4.5.3 Biomateriales.....	56
<i>II.4.5.3.1 Quitina y quitosano</i> .....	60
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	65
<b>IV. METHODOLOGY AND RESULTS OF THE EXPERIMENTAL WORK</b> .....	69

---

<b>IV.1 Chapter I: Establishment of the hASCs culture model</b> .....	73
<b>IV.1.1 Materials and methods</b> .....	73
IV.1.1.1 Chondrogenic differentiation of hASCs in standard 2D culture model.....	73
IV.1.1.2 Chondrogenic differentiation of hASCs in cell pellet culture (PC) model.....	73
IV.1.1.3 Chondrogenic differentiation of hASCs in the 3D hanging-drop culture model .....	74
<i>IV.1.1.3.1 hASCs spheroids volume quantification</i> .....	75
<b>IV.1.2 Results</b> .....	75
IV.1.2.1 Chondrogenic differentiation of hASCs in the 2D culture model .	75
IV.1.2.2 Chondrogenic differentiation of hASCs in the 3D PC culture model.....	76
IV.1.2.3 Chondrogenic differentiation of hASCs in the 3D hanging-drop culture model .....	78
<b>IV.2 Chapter II. <i>In vitro</i> degradation studies of GCS and GCS-based bionanocomposites</b> .....	81
<b>IV.2.1 Materials and methods</b> .....	83
<b>IV.2.2 Results</b> .....	84
<b>IV.3 Chapter III. Study of the chitin nanoforms mechanical and topological cues to support growth of human adipose stem cells in chitosan matrices</b> .....	93
<b>IV.3.1 Materials and methods</b> .....	93
IV.3.1.1 Preparation of 2D and 3D bionanocomposite materials.....	93
IV.3.1.2 Physical & chemical characterization of the 2D and 3D materials.....	95
IV.3.1.3 <i>In vitro</i> biocompatibility of 2D and 3D composite materials.....	98
<b>IV.3.2. Results and discussion</b> .....	100

IV.3.2.1 Synthesis and characterization of the composite 2D films and 3D scaffolds.....	100
IV.3.2.2 Morphology of the composite 2D films and 3D scaffolds .....	103
IV.3.2.3. Mechanical properties of the nanocomposite 2D films and 3D porous scaffolds .....	107
IV.3.2.4 Water uptake of the 2D films and 3D porous scaffolds .....	110
IV.3.2.5 <i>In vitro</i> cell response of the 2D films and 3D porous scaffolds ..	111
IV.3.2.5.1 <i>Cytotoxicity evaluation of 2D and 3D nanocomposite materials</i> .....	112
IV.3.2.5.2 <i>Cell adhesion studies</i> .....	113
<b>IV.3.3 Supporting Information .....</b>	<b>119</b>
<b>IV.4 Chapter IV. Chondrogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells spheroids cultured in hypoxia using a chitosan/chitin nanocrystals 3D porous scaffold as platform for cartilage tissue engineering .....</b>	<b>133</b>
<b>IV.4.1 Materials and methods.....</b>	<b>133</b>
IV.4.1.1 Synthesis of the CS/CHNC 3D porous scaffold .....	133
IV.4.1.2 hASCs spheroids formation and chondrogenic differentiation ..	133
IV. 4.1.3 hASCs spheroids volume quantification .....	134
IV.4.1.4 hASCs spheroids viability.....	135
IV.4.1.5 Histology and immunodetection.....	135
IV.4.1.6 Western blot .....	136
IV.4.1.7 hASCs spheroids adhesion and viability in the CS/CHNC 3D porous scaffold .....	137
IV.4.1.8 Chondrogenic differentiation in the CS/CHNC 3D porous scaffolds.....	138
IV.4.1.9 Statistical analysis.....	139
<b>IV.4.2 Results and discussion .....</b>	<b>139</b>
IV.4.2.1 hASCs spheroids 3D model characterization.....	139

IV.4.2.2 Evaluation of the chondrogenic differentiation in hASCs spheroids .....	141
IV.4.2.3 hASCs spheroids adhesion, viability and chondrogenic differentiation in the CS/CHNC 3D porous scaffold.....	147
<b>IV.4.3 Supporting information .....</b>	<b>152</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>155</b>
<b>VI. CONCLUSIONS .....</b>	<b>171</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>177</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Micrografía de una sección histológica del cartílago articular de un ratón teñida con hematoxilina/eosina.....	11
<b>Figura 2:</b> Micrografía de una sección histológica del cartílago hialino teñido con hematoxilina/eosina. ....	13
<b>Figura 3:</b> Ensamblaje del agregcano con el ácido hialurónico. . ....	15
<b>Figura 4:</b> Micrografía de una sección histológica de la articulación de un ratón teñida con safranina-O .....	23
<b>Figura 5:</b> Micrografía de una sección histológica de cartílago elástico de epiglotis humana con tinción para la elastina (x400). ....	24
<b>Figura 6:</b> Micrografía de una sección histológica de fibrocartílago ovino presente en los discos intervertebrales teñidos con hematoxilina/eosina (x400).. ....	25
<b>Figura 7:</b> Estructura del cartílago articular en la articulación de la rodilla de conejo. MEC del cartílago.....	28
<b>Figura 8:</b> Esquema de la interacción entre la matriz del cartílago y los condrocitos en la OA.....	32
<b>Figura 9:</b> Esquema de la respuesta del tejido y de los FLS en la AR.....	35

**Figura 10:** Elementos fundamentales de la Ingeniería Tisular. ....42

**Figura 11:** Esquema representativo de la clasificación de las células madre en función de su potencialidad para diferenciarse a distintos linajes celulares. ....43

**Figura 12:** Ensamblaje de la suspensión celular en un esferoide al producirse interacciones célula-célula a través de uniones ligando-receptor mediante cadherinas e integrinas, respectivamente .....51

**Figura 13:** Estructura molecular de las unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina presentes en la quitina..... 61

**Figura 14:** Estructura molecular del CS..... 61

**Figura 15:** Estructura molecular del genipín ..... 62

## FIGURES INDEX

**Figure 16:** Contrast-phase micrographs of hASCs cultured under (A) CM or (B) CIM for 7, 14 and 21 days in normoxia conditions..... 76

**Figure 17:** Histological staining of hASCs PC spheroids cultured in control media at 7, 14 and 21 days. .... 77

**Figure 18:** Histological staining of hASCs PC spheroids cultured in chondrogenic induction media at 7, 14 and 21 days. The arrow head marks chondrocyte-type cells surrounded by ECM..... 78

**Figure 19:** hASCs spheroids from the control group (CM) and chondrospheroids (CIM) at 7, 14 and 21 days. .... 79

**Figure 20:** Histological staining of hASCs Hanging-drop spheroids cultured in (A) control media (control group) and (B) chondrospheroids (CIM) at 7, 14 and 21 days.....80

**Figure 21:** *In vitro* mass loss (%) of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds in PBS..... 85

**Figure 22:** *In vitro* mass loss (%) of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds in PBS + 2mg/mL of lysozyme up to 84 days of culture. .... 86

<b>Figure 23:</b> <i>In vitro</i> mass loss (%) of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds with adhered hASCs up to 84 days of culture. ....	88
<b>Figure 24:</b> AFM images of chitin nanocrystals (CHNC) and chitin nanofibers (CHNF) (A); SEM pictures (x 25 000) (B); topographic AFM images using a magnification of 5x 5 microns and corresponding typical surface height profiles (C); of GCS GCS/CHNC0.5, GCS/CHNC1 and GCS/CHNC2 and GCS/CHNF0.5, GCS/CHNF1 and GCS/CHNF2; and SEM pictures of the 3D porous scaffolds: GCS, GCS/CHNC2 and GCS/CHNF2 (D). ....	104
<b>Figure 25:</b> Schematic Crosslinked Mechanism among Chitosan, Genipin, and $\alpha$ -Chitin Nanocrystals or Nanofibers (A, B) to Form the 2D or 3D Materials (C).....	106
<b>Figure 26:</b> Young's Modulus for the 2D films and 3D porous scaffolds determined with tension and compression tests, respectively (A); and compressive stress–strain curves of GCS, GCSCHNC and GCSCHNF. Curves are examples from 3 tests for each sample (B). ....	107
<b>Figure 27:</b> <i>In vitro</i> cell viability of hASCs cultured in media extracts from GCS and GCS/CHNC 2D films (A), GCS and GCS/CHNC 3D porous scaffolds (B), GCS and GCS/CHNF 2D films (C) and GCS and GCS/CHNF 3D porous scaffolds (D).....	113
<b>Figure 28:</b> Adhesion of hASCs (SEM) and viability of adhered cells (Live/Dead assay) at 3 and 7 days, respectively, in contact with studied 2D films: GCS (A), GCS/CHNC (B) and GCS/CHNF (C). ....	114
<b>Figure 29:</b> hASCs adhesion (SEM) and viability of adhered cells (Live/Dead assay) in contact with studied 3D porous scaffolds: GCS (A), GCS/CHNC and (B) CHNF. ....	116
<b>Figure 30:</b> hASCs spheroids characterization in normoxia or hypoxia conditions at 7, 14 and 21 days in terms of (A) cell viability (Live/Dead assay) and volume quantification of (B) control group and (C) chondrospheroids.....	141
<b>Figure 31:</b> Histological staining of hASCs chondrospheroids cultured at 7, 14 and 21 days under (A) normoxia (20% O <sub>2</sub> ) and (B) hypoxia (5% O <sub>2</sub> ) conditions.. ....	143
<b>Figure 32:</b> Bright field images of the hASCs chondrospheroids stained with COL2A1 and ACAN at 7, 14 and 21 d under (A) normoxia (20% O <sub>2</sub> ) and (B) hypoxia (5% O <sub>2</sub> ) conditions. Quantification of the percentage of area in the spheroids marked by (C) COL2A1 and (D) ACAN expression .....	144
<b>Figure 33:</b> Analysis of COL2A1, ACAN, HIF-1 $\alpha$ and COL1A2 protein expression by using the western blot method. As an internal control of the COL1A2, human foreskin fibroblasts (HFF) cell line was used. ....	147

**Figure 34:** Adhesion (SEM) and viability of adhered hASCs spheroids (Live/Dead assay) at 7 days in contact with the studied CS/CHNC 3D porous scaffold under (A) normoxia (20% O<sub>2</sub>) and (B) hypoxia (5% O<sub>2</sub>)..... 148

**Figure 35:** Establishment of the cartilage TE construct based on hASCs spheroids adhered to the CS/CHNC 3D porous scaffold in hypoxia conditions. .... 151

## SUPPLEMENTARY FIGURES INDEX

**Figure S1:** <sup>13</sup>C NMR spectrum of CHNC and CHNF (A); ATR-FTIR spectra (B) and X-ray diffraction (C) of CHNC and CHNF. .... 119

**Figure S2:** General aspect of the GCS and suspensions before their processing in 2D films or 3D porous scaffolds..... 122

**Figure S3:** ATR-FTIR spectra (A) and X-ray diffraction profiles (B) of GCS, GCS/CHNC and GCS/CHNF of the 2D films and 3D porous scaffolds. .... 123

**Figure S4:** *In vitro* cell viability of L-929 murine fibroblasts cultured in the extractive media from GCS and GCS/CHNC 2D films (A), GCS and GCS/CHNC 3D porous scaffolds (B), GCS and GCS/CHNF 2D films (C) and GCS and GCS/CHNF 3D porous scaffolds (D).125

**Figure S5:** L-929 murine fibroblast adhesion (SEM) and viability of adhered cells (Live/Dead staining) in contact with GCS 2D films (A), GCS 3D porous scaffolds (B), GCS/CHNC (C) and GCS/CHNF (D) 2D films, GCS/CHNC (E) and GCS/CHNF (F) 3D porous scaffolds ..... 127

**Figure S6:** Analysis of COL2A1, ACAN and HIF-1 $\alpha$  protein expression by using the western blot method in control group spheroids. .... 152

**Figure S7:** Histological staining of hASCs control group cultured at 7, 14 and 21 days under (A) normoxia (20% O<sub>2</sub>) and (B) hypoxia (5% O<sub>2</sub>) conditions. The scale bar represents 50  $\mu$ m..... 153

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1:** Moléculas de señalización presentes en un medio de diferenciación condrogénico y su función ..... 56



## TABLES INDEX

<b>Table 2:</b> Percentage (%) of the remaining wet weight of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds cultured in PBS at 84 days.....	85
<b>Table 3:</b> Percentage (%) of the remaining wet weight of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds in PBS + 2mg/mL lysozyme .....	87
<b>Table 4:</b> Percentage (%) of the remaining wet weight of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds with adhered hASCs cultured in DMEM glutamax™ and 2 mg/ml of lysozyme at 35 days.....	89
<b>Table 5:</b> Identification of the GCS, GCS/CHNC and GCS/CHNF materials .....	94
<b>Table 6:</b> General characterization of the GCS/CHNC and GCS/CHNF 3D porous materials.....	105
<b>Table 7:</b> Mechanical properties of the 2D films and 3D porous materials. ....	108
<b>Table 8:</b> General characterization of the GCS/CHNC and GCS/CHNF 2D films. ....	110

## ABREVIATURAS/GLOSSARY

<b>2D:</b>	Dos dimensiones/ <i>Two Dimensional</i>
<b>3D:</b>	Tres dimensiones/ <i>Three Dimensional</i>
<b>ACAN:</b>	Agrecano/ <i>Aggrecan</i>
<b>ADAMTS:</b>	Desintegrina con dominios metaloproteinasa y trombospondina/ <i>Desintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs</i>
<b>AEM:</b>	Agencia Europea del Medicamento
<b>AFM:</b>	Microscopía de fuerza atómica/ <i>Atomic Force Microscopy</i>
<b>ASCs:</b>	Células Madre de Tejido Adiposo/ <i>Adipose Stem Cells</i>
<b>ATCC:</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP:</b>	Adenosín trifosfato/ <i>Adenosine triphosphate</i>
<b>ATR-FTIR:</b>	Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared
<b>BMP:</b>	Proteína morfogenética del hueso/ <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
<b>CBP:</b>	Proteína de unión a CREB/ <i>CREB Binding Protein</i>

<b>CH:</b>	Quitina/ <i>Chitin</i>
<b>C.I.:</b>	Índice de cristalinidad/ <i>Chrystallinity Index</i>
<b>CIM:</b>	Medio de inducción condrogénico/ <i>Chondrogenic Induction Media</i>
<b>CM:</b>	Medio control/ <i>Control Media</i>
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Carbono dióxido/ <i>Carbon dioxide</i>
<b>COL1A2:</b>	Colágeno tipo I/ <i>Collagen type I</i>
<b>COL2A1:</b>	Colágeno tipo II/ <i>Collagen type II</i>
<b>COL10A1:</b>	Colágeno tipo X/ <i>Collagen type X</i>
<b>CS:</b>	Quitosano/ <i>Chitosan</i>
<b>CXCL6:</b>	Quimicina del ligando C-X-C/C-X-C motif Chemokine Ligand 6
<b>DAB:</b>	Diaminobencidina/ <i>Diaminobenzidine</i>
<b>DDA:</b>	Grado de deacetylación/ <i>Deacetylation Degree</i>
<b>DMEM:</b>	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco/ <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido/ <i>Dimethyl sulphide</i>
<b>ERK:</b>	Quinasa reguladora de la señal extracelular/ <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
<b>ECM:</b>	Extracellular matrix
<b>FBS:</b>	Suero bovino fetal/ <i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>FDA:</b>	Food and Drug Administration
<b>FGF:</b>	Factor de crecimiento fibroblástico/ <i>Fibroblast Growth Factor</i>
<b>FGFR:</b>	Receptor del dominio FGF/ <i>FGF Receptor Domain</i>
<b>FLS:</b>	Sinoviocitos del tipo fibroblástico/ <i>Fibroblast-Like Synoviocytes</i>
<b>FN:</b>	Fibronectina/ <i>Fibronectin</i>
<b>G:</b>	Genipín/ <i>Genipin</i>
<b>GAGs:</b>	Glucosaminoglicanos/ <i>Glycosaminoglycans</i>
<b>GCS:</b>	Genipin crosslinked quitosan
<b>GCS/CHNC:</b>	Genipin crosslinked quitosan/ <i>Chitin NanoCrystals</i>
<b>GCS/CHNF:</b>	Genipin crosslinked quitosan/ <i>Chitin NanoFibers</i>
<b>GDF:</b>	Factores de crecimiento y diferenciación/ <i>Growth and Differentiation Factors</i>
<b>H/E:</b>	Hematoxilina y Eosina/ <i>Hematoxylin &amp; Eosin</i>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Peróxido de hidrógeno/ <i>Hydrogen peroxide</i>
<b>hASCs:</b>	Células madre humans de tejido adiposo/ <i>human Adipose Stem Cells</i>

---

<b>HCl:</b>	Ácido clorhídrico/ <i>Hydrochloric acid</i>
<b>HDPE:</b>	Polietileno de alta densidad/ <i>High-Density Polyethylene</i>
<b>hESCs:</b>	Células Madre Embionarias humanas/ <i>human Embronic Stem Cells</i>
<b>HFF:</b>	Fibroblastos humanos de prepucio/ <i>Human Foreskin Fibroblasts</i>
<b>hFSCs:</b>	Células Madre Fetales humanas/ <i>human Fetal Stem Cells</i>
<b>HIF:</b>	Factor Inducible por Hypoxia/ <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
<b>HOCl:</b>	Ácido hipocloroso/ <i>Hypochlorous acid</i>
<b>HSCs:</b>	Céluals Madre Hematopoyéticas/ <i>Hematopoyetic Stem Cells</i>
<b>ICA:</b>	Implantación de Condorcitos Autólogos/ <i>Autologous Chondrocyte Implantation</i>
<b>IGF:</b>	Factor de Crecimiento del tipo Insulínico/ <i>Insuline-like Growth Factor</i>
<b>IL:</b>	Interleuquinas/ <i>Interleukines</i>
<b>iPSCs:</b>	Células Madre Pluripotentes Inducidas/ <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
<b>ISTC:</b>	Sociedad Internacional de Terapia Celular
<b>IT:</b>	Ingeniería Tisular
<b>ITS:</b>	Insulina-transferrina-ácido selenoso/ <i>Insulin-Transferrin Selenous acid</i>
<b>MACI:</b>	Implantación de condrocitos autólogos asociados a matriz/ <i>Matrix-associated Autologous Chondrocyte Implantation</i>
<b>MAPK:</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos/ <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<b>MEC:</b>	Matriz Extracelular
<b>MEM:</b>	Medio esencial mínimo/ <i>Minimum Essential Medium</i>
<b>MMP:</b>	Metaloproteinasa de matriz/ <i>Matrix Metalloproteinase</i>
<b>MSCs:</b>	Células madre mesenquimales/ <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
<b>MTT:</b>	Metil tetrazolio/ <i>Methyl Tetrazolium Tetrabromide</i>
<b>N:</b>	Newton/ <i>Newton</i>
<b>NaOH:</b>	Hidróxido de sodio/ <i>Sodium hydroxide</i>
<b>NO:</b>	Óxido nítrico/ <i>Nitric oxide</i>
<b>O<sub>2</sub>:</b>	Oxígeno/ <i>Oxygen</i>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b>	Radical superóxido/ <i>Superoxide radical</i>
<b>OA:</b>	Osteoartritis/ <i>Osteoarthritis</i>
<b>P:</b>	Porcentaje de porosidad/ <i>Porosity percentage</i>

<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino/ <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PC:</b>	Cultivo en pellet/ <i>Pellet Culture</i>
<b>PGA:</b>	Ácido poliglicólico/ <i>Poly Glycolic Acid</i>
<b>PI3K:</b>	Fosfoinositol 3-quinasa/ <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
<b>PKC:</b>	Proteína quinasa C/ <i>Protein Kinase C</i>
<b>PLA:</b>	Ácido poliláctico/ <i>Poly Lactic Acid</i>
<b>PRGF:</b>	Plasma rico en factores de crecimiento/ <i>Plasma Rich in Growth Factors</i>
<b>PVC:</b>	Policloruro de vinilo/ <i>Polyvinyl chloride</i>
<b>r:</b>	Radio/ <i>Radius</i>
<b>rpm:</b>	Revoluciones por minuto/ <i>Revolutions per minute</i>
<b>RER:</b>	Retículo Endoplásmico Rugoso/ <i>Rugose Endoplasmic Reticulum</i>
<b>RGD:</b>	Arginina-glicina-ácido aspártico/ <i>Arginylglycylaspartic acid</i>
<b>RH:</b>	Humedad relativa/ <i>Relative Humidity</i>
<b>RSTK:</b>	Proteína serina/treonina quinasas/ <i>Receptor Serine/Threonine Kinase</i>
<b>RUNX:</b>	Factores de transcripción relacionados con Runt/ <i>Runt-related transcription factor</i>
<b>SEMERGEN:</b>	Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria
<b>SEM:</b>	Microscopía electrónica de barrido/ <i>Scanning Electron Microscopy</i>
<b>SER:</b>	Sociedad Española de Reumatología
<b>sGAG:</b>	Glucosaminoglicanos sulfatados/ <i>sulphated Glycosaminoglycans</i>
<b>SRY:</b>	Proteína de la región Y determinante del sexo/ <i>Sex determining Región Y-box</i>
<b>SYND4:</b>	Sindecan/ <i>syndecan</i>
<b>SZP:</b>	Proteína de la zona superficial/ <i>Superficial Zone Protein</i>
<b>TCA:</b>	Ácido tricloroacético/ <i>Trichloroacetic Acid</i>
<b>TE:</b>	Tissue Engineering
<b>TERM:</b>	<i>Tissue Engineering and Regenerative Medicine</i>
<b>TGF:</b>	Factor de crecimiento transformante/ <i>Transforming Growth Factor</i>
<b>TLRs:</b>	Receptores del tipo Toll/ <i>Toll-like Receptors</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Factor de necrosis tumoral/ <i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>TSP-1:</b>	Trombospondina/ <i>Thrombospondin</i>
<b>VEGF:</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular/ <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>
<b>W:</b>	<i>Weight</i>
<b>XDR:</b>	Difracción de rayos X/ <i>X-Ray Diffraction</i>





## **SUMMARY**





The generation of a cartilage tissue engineering (TE) construct is currently a viable strategy for the treatment of osteoarthritis. Such construct requires a biomaterial with optimal properties, including biocompatibility, biodegradability and porosity, among others. Natural polymers like, CH and CS are attractive building block for the development of biomaterials for TE applications. We investigated the role of the incorporation of chitin nanoforms (*i.e.*, nanocrystals or nanofibers) into Genipin-Chitosan crosslinked (GCS) matrices designed in two different shapes, 2D films and 3D porous scaffolds. The aim was to assess the potential of these biomaterials as support for L-929 murine fibroblast cell line and human adipose-derived stem cells (hASCs) growth.

The incorporation of chitin nanocrystals or nanofibers on the GCS 2D films and 3D porous scaffolds displayed better swelling properties and enhanced the mechanical performance when compared to nanoform-free GCS materials. Furthermore, these biomaterials provide topological cues to support hASCs growth. The incorporation of low concentration of chitin nanoforms, in particular, was found to be the most appropriate supports for the proliferation and adhesion of hASCs.

As cell source, hASCs have shown potential for cartilage regeneration when cultured in the appropriate conditions. Moreover, it has been suggested that physiological low oxygen (hypoxia) can significantly improve hASCs adhesion, proliferation and chondrogenic differentiation while preventing their osteogenic differentiation. We first investigated the chondrogenic potential of the hASCs spheroids and demonstrated that were positive to cartilage-specific markers including collagen type II (COL2A1) and aggrecan (ACAN), while lacked expression in the osteogenic differentiation marker collagen type I (COL1A2). Moreover, hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , which positively directs COL2A1 and ACAN expression, was upregulated in chondrospheroids cultured under hypoxia.

Finally, this 3D culture hypoxic system created a pro-chondrogenic environment that allowed hASCs to differentiate into the chitosan/chitin nanocrystals 3D porous scaffold producing a chondral extracellular matrix with a high sulphated glucosaminoglycan content, which is characteristic of articular cartilage. This 3D chondrogenic differentiation model mimics the *in vivo* cartilage environment during the embryonic development, which entails a further step in cartilage TE, having potential application for articular cartilage regeneration.

## **I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**



Las enfermedades degenerativas asociadas al aparato locomotor, como son la osteoartritis y la artrosis, suponen un reto en el área de la investigación debido a su alta prevalencia derivada del envejecimiento de la población y a su coste socio-sanitario.

La artrosis es un síndrome de dolor articular acompañado de diversos grados de limitación funcional y reducción de la calidad de vida. Se caracteriza por una pérdida de cartílago articular, remodelación del hueso subyacente y cierto grado de inflamación asociada.

Actualmente, el tratamiento de la artrosis es fundamentalmente sintomático, dirigiéndose principalmente al alivio del dolor, mejorar la movilidad articular y al mantenimiento de la funcionalidad global de la articulación. En la actualidad no existe tratamiento curativo para estos procesos y las actuaciones terapéuticas son, por lo tanto, exclusivamente de tipo paliativo y de atención social. Por estas razones, resulta necesario el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas que aborden algunos de los elementos clave de la fisiopatología de estas enfermedades.

La ingeniería tisular ofrece una opción terapéutica prometedora para la reparación de lesiones traumáticas y degenerativas del cartílago articular. La terapia idónea precisa de un componente celular y un biomaterial que sirva de soporte físico y trófico para la construcción del injerto.

En la presente introducción se abordan los conceptos de cartílago articular, los mecanismos por los cuales se produce la degeneración del cartílago articular, las terapias utilizadas actualmente en clínica y la terapia con células madre como nueva vía de abordaje de las enfermedades degenerativas del cartílago articular.







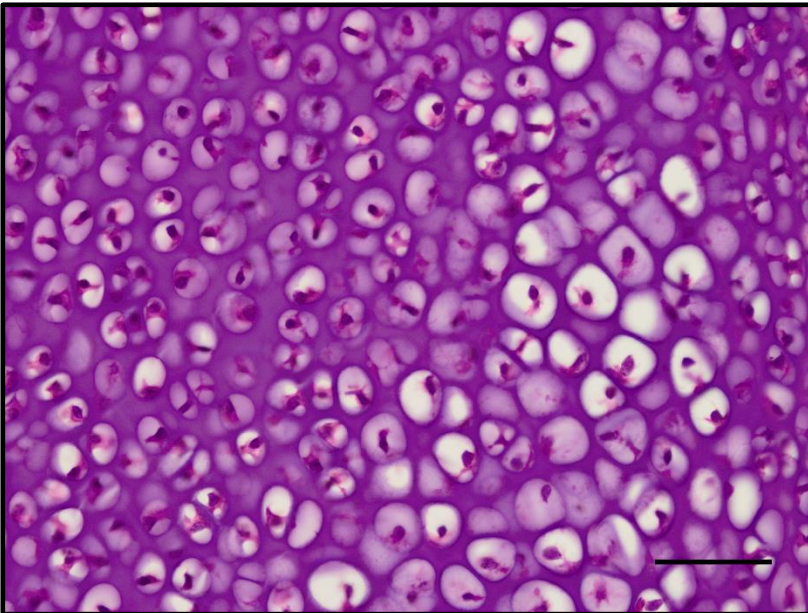


## **II. INTRODUCCIÓN**



## II.1 EL CARTÍLAGO

El cartílago es un tejido conectivo especializado constituido por elementos celulares (condroblastos y condrocitos) que se encuentran distribuidos de forma dispersa en una matriz extracelular (MEC) de tipo gel y limitado por el pericondrio (capa de tejido conjuntivo denso irregular que rodea al tejido cartilaginoso). Se trata de un tejido avascular y carente de inervación, cuyas células alojadas en pequeñas cavidades o lagunas, se nutren mediante difusión a través de la fase acuosa de la matriz. En el cartílago humano maduro solo hay un 1-5% de células del total de su volumen, mientras que los componentes de la MEC representan el 95-99% restante (Figura 1).



**Figura 1:** Micrografía de una sección histológica del cartílago articular de un ratón teñida con hematoxilina/eosina. La imagen ha sido obtenida en el laboratorio de Ingeniería Tisular de la Facultad de Medicina y Enfermería de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). La barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ .

El cartílago está presente en diferentes áreas del cuerpo, formando parte del esqueleto fetal, superficies articulares, extremos costales, discos intervertebrales,

pabellón auricular, laringe, tráquea, vías respiratorias conductoras, apéndice nasal, etc. donde desempeña un papel estructural.

### II.1.1 Componentes celulares

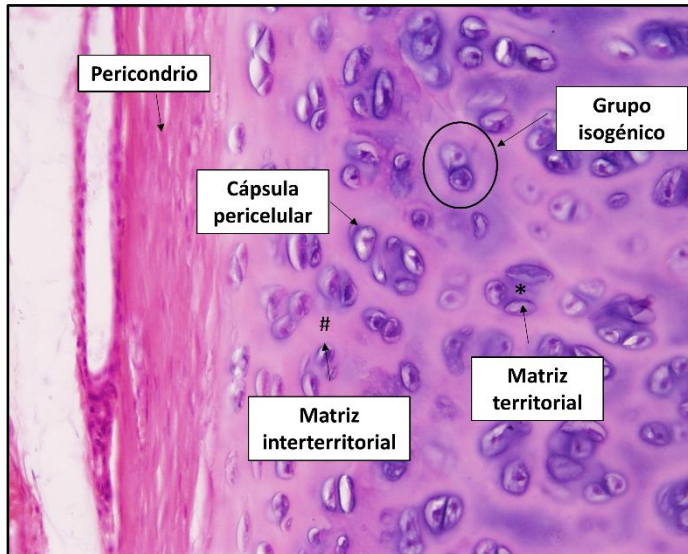
La formación del cartílago comienza con la diferenciación de células mesenquimales en células precursoras del cartílago denominadas **condroblastos**. Estas células se ubican en la capa celular interna del pericondrio ocupando lagunas ovas en sentido paralelo a la superficie. Presentan gran desarrollo de orgánulos encargados de la síntesis de proteínas, abundante retículo endoplasmático rugoso (RER), aparato de Golgi, numerosas mitocondrias y orgánulos de secreción. Además de estos orgánulos, contienen gotas lipídicas y glucógeno en el citoplasma (Kierszenbaum y Tres, 2016).

El tamaño del aparato de Golgi y las características del RER varían en función de la fase de crecimiento en la que se encuentra el cartílago. Así, durante el crecimiento activo, el aparato de Golgi aumenta su tamaño y el RER presenta unas cisternas dilatadas. Sin embargo, cuando el cartílago cesa el crecimiento, ambos orgánulos recuperan su nivel de desarrollo basal (Rosales, 2008).

Las divisiones mitóticas de los condroblastos dan lugar a una progenie de células que permanecen en el mismo espacio o laguna formando de esta manera un **grupo isogénico**. Estas células comienzan a sintetizar la sustancia fundamental amorfa (compuesta por agua y proteoglucanos) y el material extracelular fibrilar. La secreción del material extracelular atrapa a cada condroblasto en el interior de la matriz cartilaginosa, separándolos unos de otros. A continuación, cada condroblasto experimenta una o más divisiones mitóticas y forma un pequeño grupo de células maduras separadas por una pequeña cantidad de material extracelular. Estas células aisladas se denominan **condrocitos** (Kierszenbaum y Tres, 2016).

Los condrocitos son las células más diferenciadas del cartílago, que desempeñan un papel importante en la homeostasis del tejido, produciendo y regulando los

componentes de la MEC (Camarero-Espinosa y *cols.*, 2016). Cada condrocito está rodeado por una matriz pericelular y, a su vez, encapsulado por la cápsula pericelular. A este conjunto se le denomina condrón o condrona y constituye la unidad histológica, citogenética y mecánica del cartílago (Vega y *cols.*, 2002) (Figura 2).



**Figura 2:** Micrografía de una sección histológica del cartílago hialino teñido con hematoxilina/eosina. La imagen ha sido obtenida de la escuela de anatomía y biología humana de la Universidad Western Australia (x200). (<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/Big/hyc20he.jpg>)

Estas células presentan un tamaño grande (alrededor de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro), forma esférica con bordes planos, un núcleo prominente, abundante RER y aparato de Golgi, además de inclusiones lipídicas y glucógeno en su citoplasma. Su disposición varía en función de la profundidad del cartílago. Así, los condrocitos maduros se ubican en la zona más profunda (Rosales, 2008).

### II.1.2 Matriz extracelular (MEC)

La MEC del cartílago está compuesta principalmente por agua (70-80%), que es el componente mayoritario de la sustancia fundamental amorfa y por fibras de colágeno.

### II.1.2.1 Colágeno

El colágeno es una de las proteínas más abundantes de la MEC presente en el cuerpo humano. Esta proteína es secretada por los condrocitos en una forma soluble de trímeros de procolágeno, que son posteriormente procesados por proteinasas específicas amino-terminal y carboxilo-terminal localizadas en la MEC.

Se han identificado más de 28 isoformas diferentes, siendo el colágeno tipo II, el más abundante y constituye uno de los componentes más importantes de la MEC del cartílago hialino (aproximadamente el 40% de su peso seco), acompañado de algunas fibras de colágeno de tipos IX, X y XI. Se organiza con diferente orientación según la profundidad a la que se encuentra y es el responsable de conferir la rigidez del tejido, que le proporciona la capacidad de soportar grandes cargas (Camarero-Espinosa y cols., 2016).

Otras formas de colágeno, como los tipos I y X también se encuentran en el cartílago hialino (Eyre y Wu, 1995). El colágeno tipo I sólo está presente en la superficie del cartílago, formando parte del pericondrio, mientras que el colágeno tipo X tiene una distribución muy restringida, limitada a la matriz inmediatamente adyacente a las zonas de hipertrofia condrocitaria en las zonas de osificación endocondral. Por otro lado, el colágeno tipo VI se encuentra en el microambiente circundante (matriz pericelular o territorial) de los condrocitos y también juega un papel importante en las propiedades mecánicas de las células (Eyre, 2002).

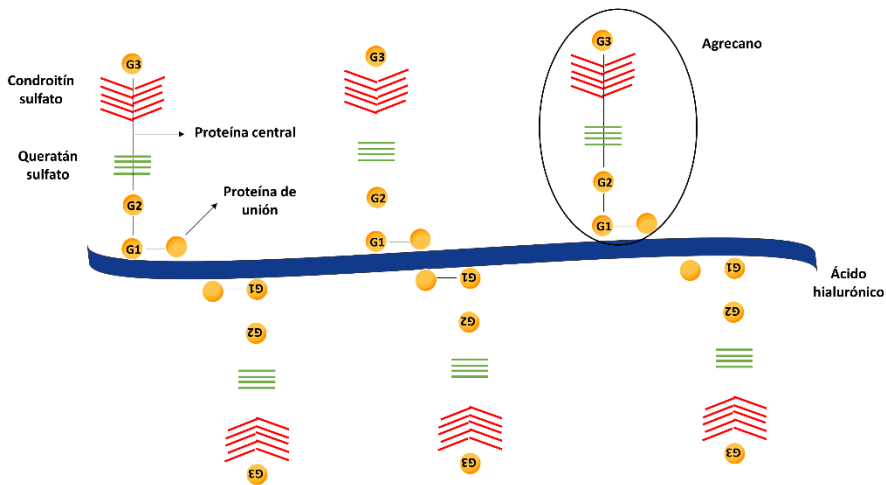
### II.1.2.2 Proteoglucanos

Los proteoglucanos son una familia de glucoconjugados compuestos por un centro de proteína, a partir del cual emergen perpendicularmente polisacáridos, principalmente glucosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs son polisacáridos lineales, no ramificados, cuyas unidades de repetición están compuestas por disacáridos unidos por enlaces glucosídicos. Entre los GAGs más comunes se encuentran el agregano, ácido hialurónico, dermatán, queratán y condroitín 4 ó 6-sulfato (Knudson y Knudson, 2001). Además, existen otros

proteoglucanos como el sindecan, glican y perlican, localizados en la matriz pericelular, que se producen en menor cantidad (Gartner y Hiatt, 2015).

El **agrecano** es el GAG más abundante y el que juega un papel crucial en el funcionamiento del cartílago hialino. Está constituido en el 90% de los casos por agregados de condroitín sulfato, aunque también se incluyen cadenas de queratán sulfato (Kiani y cols., 2002), como se muestra en la figura 3. Debido a los grupos sulfato que tienen, las moléculas de agrecano poseen una gran carga negativa con elevada afinidad por las moléculas de agua.

El **ácido hialurónico** es un polisacárido sintetizado predominantemente por células de origen mesenquimal (fibroblastos, condroblastos, condroctitos, etc). Es el único polisacárido de la familia de los GAGs que no contiene azufre ni está unido covalentemente a proteínas. Cada molécula de ácido hialurónico se asocia con una gran cantidad de moléculas de agrecano (más de 300) para formar grandes **aglomeraciones de proteoglucanos** (Ross y Pawlina, 2012).



**Figura 3:** Ensamblaje del agrecano con el ácido hialurónico. Las moléculas de condroitín sulfato y queratán sulfato se unen al centro de la proteína entre los dominios globulares G2 y G3 formando el agrecano (marcado con la línea continua). La imagen ha sido modificada de Camarero-Espinosa y cols., 2016.

### II.1.2.3 Otras moléculas

Además de los proteoglicanos, existen otras glucoproteínas y proteínas no glucosiladas que están presentes en menor cantidad. Entre las glucoproteínas de adhesión, se encuentra la **condronectina** que presenta puntos de unión a los condrocitos, a las fibras de colágeno II y a los elementos que integran los complejos de agregano.

Otra molécula adicional, crítica para la función del cartílago, es la proteína de la zona superficial (SZP, del inglés *superficial zone protein*), también conocida como PRG4 o **lubricina**. Se trata de una proteína presente en la zona superficial del cartílago articular y en el líquido sinovial, que se une al ácido hialurónico y juega un papel vital en la lubricación de la superficie articular (Schumacher y cols., 1994; Flannery y cols., 1999).

### II.1.3 Condrogénesis

Durante el desarrollo embrionario, se produce la formación de tres capas de células germinales denominadas mesodermo, ectodermo y endodermo. Las células madre mesenquimales (MSCs, del inglés *mesenchymal stem cells*) derivan del mesodermo y forman los componentes del esqueleto apendicular transcurridas las cuatro semanas de gestación.

La diferenciación de las células del epiblasto (etapa de gastrulación) a linaje mesodérmico está mediada por las vías de señalización Wnt3a y activina/nodal. Una vez formado el mesodermo, la familia de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP, del inglés *bone morphogenetic protein family*), en concreto de la BMP-4 y la BMP-2 y la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés *fibroblast growth factor*) regulan el proceso de formación del mesénquima (Cheng y cols., 2014).

Las MSCs tienen una morfología fibroblastoide, estrellada y con prolongaciones citoplasmáticas. Durante el desarrollo de las extremidades, esta población celular comienza un proceso de contacto célula-célula y célula-sustrato, dando lugar a la



condensación celular. En este momento, las MSCs comienzan una diferenciación hacia células precondrogénicas, formando el primordio cartilaginoso (Camarero-Espinosa y cols., 2016). La condrogénesis se inicia en el área central de la condensación mesenquimal y se irradia hacia el exterior. Además, se produce un cambio en la morfología fibroblástica de las MSCs, que pasan a ser esféricas, y comienzan a secretar una MEC rica en colágeno II y proteoglucanos, como el agregano.

En el estadio inicial de la diferenciación, el factor de transcripción más importante que regula la condrogénesis es SOX-9 (de la familia de los genes *Sex determining region Y-box 9*, SRY). Éste se asocia con SOX-5 y SOX-6 (Akiyama y cols., 2002) para controlar la diferenciación condrogénica, mantener el fenotipo del condrocito y regular directamente la expresión de moléculas de la MEC (Liao y cols., 2014). SOX-9 se expresa en células condroprogenitoras y a lo largo de la vida de los condrocitos, aunque hay un silenciamiento de su expresión cuando los condrocitos alcanzan la hipertrofia en la placa de crecimiento. Asimismo, SOX-9 también regula positivamente el factor de transcripción Col2A1 (Bell y cols., 1997) uniéndose a la región promotora con coactivadores como Znf219 (Takigawa y cols., 2010), PCG-1 $\alpha$  (Kawakami y cols., 2005) y CBP/p300 (Furumatsu y cols., 2005).

Entre las moléculas reguladoras, RUNX2 (del inglés *runt-related transcription factor 2*) es un factor de transcripción clave que regula la formación de hueso y está también implicado en los estadios iniciales de la condensación. Cuando se inicia la condrogénesis, SOX-9 induce la degradación de RUNX2 por la vía lisosomal, mientras que durante la diferenciación osteoblástica, RUNX2 inhibe la actividad de SOX-9 y, de esta forma, se bloquea la condrogénesis (Cheng y Genever, 2010).

La expansión de los centros de condricación ya formados se lleva a cabo por dos mecanismos. Por un lado, el mesénquima que rodea al cartílago en desarrollo se condensa y forma el pericondrio. Las células de su parte interna (capa condrogénica), constituida por los condroblastos, proliferan y se diferencian hacia condrocitos al secretar MEC al espacio extracelular y, por tanto, quedan incorporados en el cartílago. Este mecanismo de adición de las células y matriz en la zona más superficial se denomina **crecimiento**

**apositional**. Este mecanismo, propio de los huesos largos, contribuye al crecimiento en grosor de los moldes cartilagosos (Kierszenbaum y Tres, 2016).

Por otro lado, en el interior del cartílago y, durante un cierto periodo de tiempo, los condrocitos se dividen y el cartílago crece a expensas de la formación de células y de matriz en su interior. A este crecimiento se le denomina **crecimiento intersticial**, y da lugar a la acumulación de cuatro o más condrocitos en las lagunas, pertenecientes a la misma progenie. La matriz inmediatamente adyacente a estos grupos isogénicos se denomina **matriz territorial** y ocupa una superficie variable en los distintos cartílagos. Esta matriz contiene mayoritariamente GAGs, en concreto el condroitín sulfato, y presenta una escasa densidad de fibras de colágeno. Por el contrario, la **matriz interterritorial** constituye la matriz situada entre las zonas de matriz territorial asociada a los grupos isogénicos. Se trata de una matriz rica en fibras de colágeno y presenta una menor cantidad de GAGs.

Durante la condrogénesis están implicados una serie de factores de crecimiento fundamentales que participan en las diferentes vías de señalización que regulan este proceso.

### II.1.3.1 Superfamilia de los TGF- $\beta$

Los miembros de la superfamilia de los factores de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ , del inglés *transforming growth factor*) se unen a los receptores transmembrana serina-treonina quinasa (RSTKs, del inglés *receptor serine/threonine kinase*), también llamados receptores del tipo I y II, promoviendo la activación de vías de señalización que están involucradas en el desarrollo y la homeostasis de una gran variedad de tejidos (Kwon y cols., 2016; Huang y cols., 2017), entre ellos en el desarrollo del cartílago.

Este factor es clave en todos los estadios de la condrogénesis, incluyendo la condensación de las MSCs, proliferación de los condrocitos, diferenciación terminal y producción de MEC. Además, el TGF- $\beta$  estimula la proliferación de los condroblastos y la

expresión de genes específicos del cartílago, como los que codifican para la síntesis de agreganos y colágeno tipo II.

Las señales de TGF- $\beta$  se traducen mediante los receptores de tipo II que fosforilan los receptores de tipo I, dando como resultado la activación de las proteínas Smad (Smad2 y 3). Algunos estudios han mostrado que la señalización de TGF- $\beta$  durante la condrogénesis y la maduración de los condrocitos está mediada en mayor medida por Smad3 que por Smad2 (De Kroon y cols., 2017).

Por otro lado, la activación de Smad3/4, mediada por el TGF- $\beta$ , estimula la transcripción de SOX-9. Esto promueve la asociación de SOX-9 con Smad3 y p300 (co-activador transcripcional) y así se promueve la condrogénesis. Asimismo, el TGF- $\beta$  inhibe la hipertrofia de los condrocitos, suprimiendo la expresión de colágeno X, la metaloproteína de matriz 13 (MMP, del inglés *matrix metalloproteinase*), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*) y la osteocalcina (Furumatsu y cols., 2005).

El TGF- $\beta$  también activa proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*). Son quinasas reguladoras de las señales extracelulares ERK (del inglés *extracellular signaling regulated kinase*) y p38 que regulan la condrogénesis (Li y cols., 2010).

### **II.1.3.2 Proteínas morfogénicas del hueso (BMPs)**

Las BMPs están implicadas en diferentes estadios del desarrollo esquelético y juegan un papel importante en la condrogénesis y la osteogénesis *in vivo* (Hingert y cols., 2017).

En relación a la condrogénesis, las BMPs modulan la diferenciación condrogénica de las MSCs a través de distintas vías de señalización, entre las cuales se encuentra la activación de la vía p38 (Nakamura y cols., 1999) y la implicación de la familia SOX. Las

BMPs inducen la expresión de SOX-9, que actúa como desencadenante de la expresión de marcadores condrogénicos. De forma similar, las BMPs inducen la activación de SOX-6 de manera dosis-dependiente, lo que permite la unión de SOX-6 al gen promotor del colágeno tipo II y así promover su expresión (Kwon y cols., 2016).

Además de la implicación de las BMPs durante la condrogénesis, también inducen la proliferación y maduración de los condrocitos en las placas de crecimiento, proceso fundamental en la formación de las articulaciones que juegan un papel importante en las (Pogue, 2006; Nishimura y cols., 2012).

El efecto biológico sobre la condrogénesis y las placas de crecimiento es ejercido por diferentes tipos de BMPs. Así, la BMP-2 juega un papel esencial en el proceso de condensación de las MSCs y estimula la síntesis de las proteínas de la matriz del cartílago (Pogue, 2006). De manera similar, la BMP-4 promueve la producción de matriz incrementando la expresión de colágeno tipo II y de agreganos; además, la BMP-4 suprime la expresión de colágeno tipo X, evitando así la hipertrofia de los condrocitos (Miljkovic y cols., 2008). Por otro lado, la BMP-7 es sintetizada por condrocitos en fase de proliferación cerca del pericondrio y promueve la síntesis de proteínas de la matriz del cartílago (Danišovič y cols., 2012). Por último, la BMP-14, también conocida como GDF-5, se expresa en la fase inicial de la condensación, e induce la supervivencia de las MSCs y la maduración de los condrocitos (Takahara y cols., 2004).

### **II.1.3.3 Factor de crecimiento del tipo insulínico (IGF)**

Al igual que los factores que se han explicado anteriormente, el IGF (del inglés *insulin like growth factor*) tiene múltiples funciones en el desarrollo del cartílago (Ikeda y cols., 2017). Es un factor de crecimiento clave para la síntesis de MEC por parte de las MSCs y de su diferenciación hacia condrocitos. Esta función se lleva a cabo por la vía fosfoinositol-3-quinasa (PI3K, del inglés *phosphoinositide 3-kinase*), activando la

señalización de la vía ERK (del inglés *extracellular signal-regulated kinase*), la quinasa p38 y la proteína quinasa C (PKC, del inglés *protein kinase C*).

Se ha demostrado que las isoformas de IGF, IGF-1 e IGF-2 promueven el crecimiento de los condrocitos (Vetter y *cols.*, 1986). Así, IGF-1 induce la proliferación de las MSCs y promueve la expresión de colágeno tipo II al unirse a SOX-9 y a proteínas específicas como Sp1/Sp3 (Renard y *cols.*, 2012). El efecto de IGF-1 durante la diferenciación condrogénica de las MSCs se puede ver incrementado con la presencia de TGF- $\beta$  y BMPs (Longobardi y *cols.*, 2006). Por su parte, el IGF-2 regula la expresión de genes como el colágeno tipo II, los agreganos y el colágeno X (Uchimura y *cols.*, 2017).

#### **II.1.3.4 Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)**

La familia del FGF está formada por 22 proteínas estructurales relacionadas entre sí, que comparten propiedades bioquímicas y funcionales. Existen tres receptores del dominio FGF (FGFR), el FGFR1, FGFR2 y FGFR3. En la condensación mesenquimal, el FGFR2 se expresa en el ectodermo, mientras que el FGFR1 lo hace en la periferia del mesénquima que se está condensando. Finalmente, el FGFR3 se expresa con la diferenciación y proliferación de los condrocitos (Ornitz e Itoh, 2001).

Otros miembros de la familia del FGF también contribuyen a la condrogénesis (Pizzute y *cols.*, 2016). En concreto, se ha observado en condrocitos primarios de ratón que FGF-1, FGF-2 y FGF-7 promueven la expresión de SOX-9 por la vía ERK1/2 (Murakami y *cols.*, 2000). También se ha demostrado que el FGF, TGF- $\beta$  y proteínas de la familia *Wnt* controlan los diferentes estadios de diferenciación condrogénica, incrementando la actividad de SOX-9 (Kwon y *cols.*, 2016).

### II.1.4 Tipos de cartílago

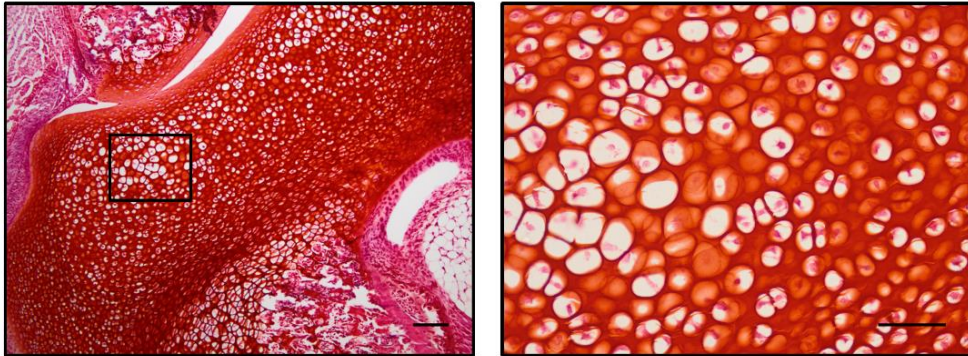
Se diferencian tres tipos de cartílago: hialino, elástico, y fibrocartílago. Cada uno de ellos con características bioquímicas, mecánicas y estructurales diferentes, dependiendo de la cantidad relativa de MEC y el tipo de fibras de colágeno o elastina presentes en ella (Finn, 2002).

- *Cartílago hialino*

El cartílago hialino se caracteriza por presentar una matriz amorfa, homogénea y de aspecto vítreo. Su nombre proviene del aspecto transparente de la matriz (del griego *hyalos*, cristal). En toda la extensión del cartílago se encuentran espacios, llamados lagunas, que contienen los condrocitos. Estas lagunas están rodeadas de matriz, que consta de fibrillas de colágeno, en su mayoría tipo II, y sustancia fundamental amorfa. El cartílago hialino está limitado por el pericondrio (excepto en los cartílagos articulares), que está compuesto por una capa externa fibrosa de colágeno tipo I y una capa celular interna constituida por condroblastos (Morales, 2010).

Se encuentra en diferentes localizaciones en el organismo en formación y en el adulto: la superficie articular de las articulaciones sinoviales, la unión de las costillas al esternón y las vías respiratorias (la estructura de la laringe, en gran parte del tabique nasal, tráquea y bronquios). Además, constituye el esqueleto del feto y la estructura sobre la cual se desarrollará el hueso en el proceso de osificación endocondral, persistiendo en la placa epifisaria hasta que cesa el crecimiento óseo.

Durante su desarrollo, el cartílago hialino adquiere una estructura y composición que proporciona amortiguación contra los impactos, y ofrece una superficie lubricada para las articulaciones. Esta composición e interacción es la responsable de las propiedades mecánicas únicas de este tejido. La Figura 4 muestra el cartílago hialino de una sección histológica de la articulación de un ratón teñida con Safranina-O, que se une a los GAGs del cartílago, dando como resultado una coloración anaranjada.



**Figura 4:** Micrografía de una sección histológica de la articulación de un ratón teñida con safranina-O, donde cartílago hialino se tiñe en una tonalidad naranja. La imagen ha sido obtenida en el laboratorio de Ingeniería Tisular de la Facultad de Medicina y Enfermería de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$  (imagen izquierda) y 50  $\mu\text{m}$  (imagen derecha)

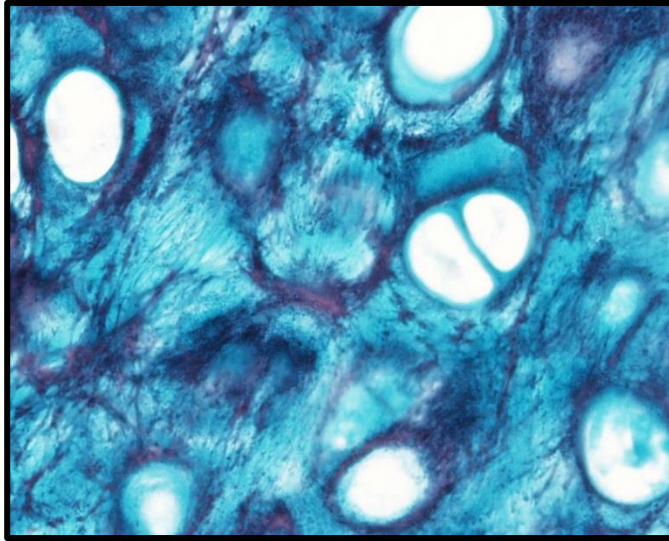
- *Cartílago elástico*

El cartílago elástico está presente en el pabellón auricular, las paredes del conducto auditivo externo, trompa de Eustaquio, epiglotis y en los cartílagos corniculados y cuneiformes de la laringe. La función del cartílago elástico es el mantenimiento de la forma y la flexibilidad de los órganos en los que se encuentra (Gartner y Hiatt, 2015).

La variedad elástica se distingue de la hialina por su mayor opacidad, color amarillento y mayor flexibilidad. La MEC es menos abundante y la mayor parte de su sustancia fundamental está constituida por abundantes fibras elásticas dispuestas en forma de finas redes, entre cuyos espacios se disponen los condrocitos (Young y cols., 2014). Al igual que el cartílago hialino, el elástico también presenta pericondrio.

Los condrocitos que forman el cartílago elástico son similares a los del cartílago hialino, aunque presentan mayor tamaño y, al igual que los del cartílago hialino, se encuentran en lagunas dispuestas aisladamente o en grupos isogénicos de dos a cuatro células.

La observación de las fibras elásticas en preparaciones histológicas se realiza empleando técnicas de coloración específicas como la orceína, resorcina-fucsina, elástica de Van Giesson, etc. (Young y cols., 2014; Figura 5).



**Figura 5:** Micrografía de una sección histológica de cartílago elástico de epiglotis humana con tinción para la elastina (x400). La imagen ha sido obtenida de la escuela de anatomía y biología humana de la Universidad Western Australia (<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/Big/elc40el.jpg>).

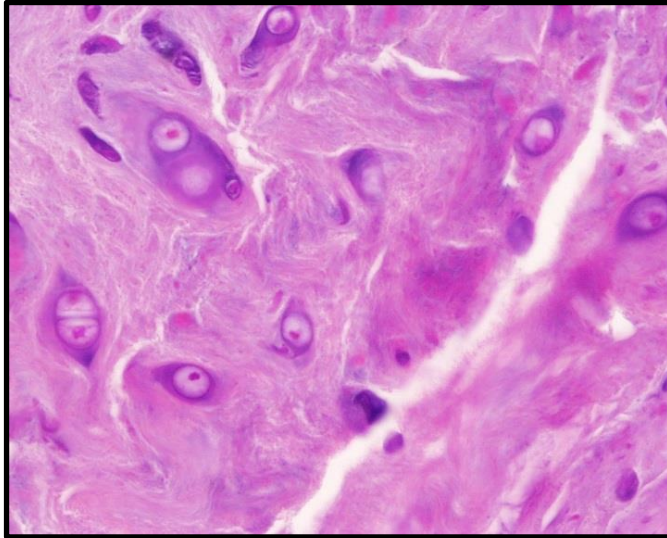
- *Fibrocartílago*

El fibrocartílago se encuentra en los discos intervertebrales, sínfisis púbica y en la interfase entre ligamentos y tendones con el hueso. Se compone de fibroblastos y escasos condrocitos dispuestos en hileras entre haces paralelos de fibras de colágeno tipo I y escasa cantidad de sustancia fundamental amorfa. Este tipo de cartílago carece de pericondrio y se considera un tejido intermedio entre el cartílago hialino y el tejido conjuntivo denso (Young y cols., 2014; Figura 6).

Las células se sitúan en el interior de las lagunas con una cápsula muy delgada que puede ser basófila, aunque el tejido suele ser, en conjunto, acidófilo debido al



predominio de las fibras de colágeno tipo I. Los grupos isogénicos se componen de pocos condrocitos y la escasa matriz amorfa es rica en condroitín sulfato y dermatán sulfato (Gartner y Hiatt, 2015).



**Figura 6:** Micrografía de una sección histológica de fibrocartilago ovino presente en los discos intervertebrales teñidos con hematoxilina/eosina (x400). La imagen ha sido obtenida de la escuela de anatomía y biología humana de la Universidad Western Australia (<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/Big/fic40he.jpg>).

## II.2. EL CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago articular es un cartílago de tipo hialino que se encuentra en la superficie los extremos óseos tras completarse la osificación endocondral. Se caracteriza porque la superficie libre carece de pericondrio, pero contiene células condrocíticas formando columnas perpendiculares a la superficie. La parte opuesta a la superficie libre se encuentra calcificada y unida al hueso (Kierszenbaum y Tres, 2016).

La función del cartílago articular es soportar y amortiguar la tensión mecánica de las superficies articulares. Su estructura varía desde la superficie hasta la zona más

profunda del cartílago. La orientación de sus constituyentes, composición de la MEC, así como la morfología y disposición de los condrocitos varía a lo largo de la profundidad del cartílago.

La superficie articular del cartílago está recubierta por una capa fina denominada *lamina splendens*, que está compuesta por proteínas. Su grosor comprende desde unos pocos cientos de nanómetros hasta una micra. Se piensa que la *lamina splendens* se ha formado por acumulación de proteínas del líquido sinovial y que sirve de superficie protectora para el cartílago, aunque su función exacta todavía se desconoce (Thambyah y Broom, 2007).

La estructuración en capas se genera después de un proceso de maduración y como resultado de fuerzas hidrostáticas ejercidas en el tejido. Se pueden identificar las siguientes zonas: *i*) zona superficial o tangencial que limita con el espacio articular, *ii*) zona media o de transición, *iii*) zona profunda y *iv*) zona calcificada (Williams y cols., 2008).

- *Zona superficial o tangencial*

Bajo la *lamina splendens* se encuentra la zona superficial que comprende un 10-20% del grosor del cartílago. En esta zona, las fibras de colágeno tienen un menor diámetro que en zonas más profundas y están ordenadas de forma paralela a la superficie, con una disposición altamente empaquetada. La concentración de proteoglicanos es baja y, así, la permeabilidad del tejido es mayor que en otras zonas del cartílago. Los condrocitos de esta región son los responsables del crecimiento aposicional del cartílago. Presentan una morfología plana, se disponen paralelos a la superficie y secretan proteínas lubricantes como la SZP y fibras de colágeno tipo I, que no están presentes en otras zonas (Knudson, 2001).

- *Zona media o de transición*

La zona media o de transición representa el 40-60% del grosor del cartílago y se caracteriza por tener una baja densidad celular. El colágeno tipo II es el componente

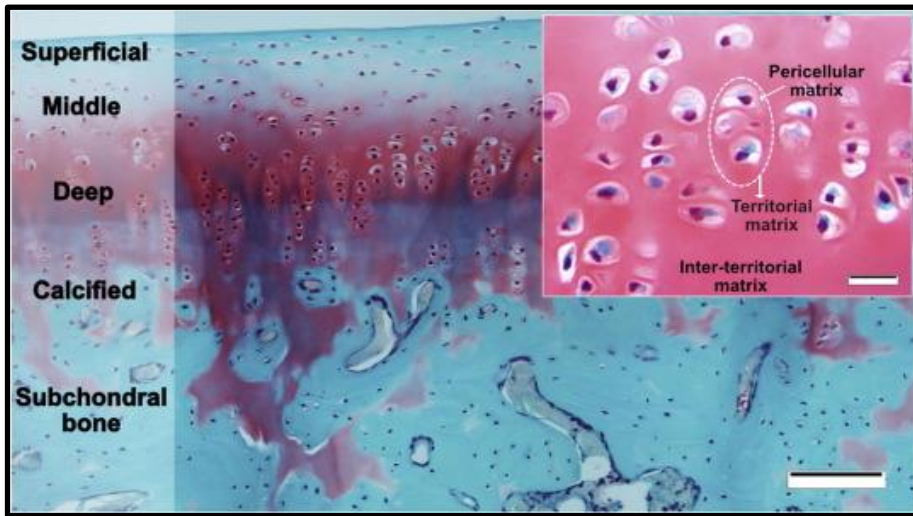
mayoritario de la matriz extracelular de esta zona y aquí se encuentra el mayor contenido de proteoglucanos. Los condrocitos presentan una morfología esferoidal y sintetizan grandes cantidades de colágeno tipo II y proteoglucanos del tipo de los agreganos (Knudson, 2001).

- *Zona profunda*

La zona profunda, junto con la calcificada (supone el 20-50% del grosor del cartílago), se caracteriza por la disposición perpendicular de las células y las fibras de colágeno con respecto al hueso subcondral. Los condrocitos se orientan en columnas cortas en la dirección del colágeno y producen y secretan menor cantidad de colágeno tipo II. La densidad celular es menor con respecto a la zona media y superficial, mientras que la cantidad de proteoglucanos se ve incrementada. El colágeno tipo X también está presente en esta zona (Knudson, 2001).

- *Zona calcificada*

La zona calcificada se caracteriza por la calcificación de su matriz y por poseer condrocitos de menor tamaño. Esta zona está separada de la profunda por una línea regular, ondulada y muy calcificada que recibe el nombre de *marca de marea*. Durante los procesos de renovación del cartílago articular, los condrocitos migran desde esta región hacia la superficie articular libre (Broom y Poole, 1982). La Figura 7 muestra la estructuración en capas del cartílago articular.



**Figura 7:** Estructura del cartílago articular en la articulación de la rodilla de conejo. La sección está teñida con Safranina-O/Fast Green y muestra la organización del cartílago articular en zonas. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$  en la imagen de menor aumento. En la imagen de mayor aumento se indican las diferentes regiones de la MEC del cartílago y la barra de escala representa 20  $\mu\text{m}$ . La imagen ha sido tomada de Armiento y cols., 2018.

- *El líquido sinovial*

El líquido sinovial es un producto viscoso compuesto por las células sinoviales y el ultrafiltrado de los capilares. Está compuesto por una mezcla de plasma rico en proteínas, ácido hialurónico y glucoproteínas (Hui y cols., 2012). Este líquido permite el deslizamiento de las superficies articulares sin que se produzcan lesiones por el rozamiento de las superficies.

El líquido sinovial, además, es el responsable de la nutrición del cartílago articular, así como de la eliminación de desechos. El transporte de nutrientes a través del cartílago ocurre por difusión durante el proceso de compresión-relajación del tejido. El ritmo de reposición es de una hora para las proteínas y moléculas pequeñas y trece horas para moléculas de mayor tamaño como el ácido hialurónico (Camarero-Espinosa y cols., 2016).

Por último, el líquido sinovial también desempeña un papel importante en la capacidad que tiene el cartílago de soportar cargas. Cuando se aplica una fuerza de presión al cartílago, el fluido responde incrementando su viscosidad para aumentar su resistencia.

### II.3 PATOLOGÍAS DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

Como se ha comentado anteriormente, el cartílago está constituido por una población de células con diferente grado de diferenciación (condroblastos y condrocitos) responsables de la síntesis y mantenimiento de una densa y altamente organizada MEC. Esta matriz, además de proporcionar la base estructural para las superficies de deslizamiento y absorción de impacto, constituye un andamiaje (*scaffold*) que promueve la señalización química y la estabilidad fenotípica para los condrocitos.

Las patologías propias del cartílago articular presentan distinta etiología. A lo largo de la vida, el cartílago está condicionado por un desgaste interno debido las cargas mecánicas externas soportadas y este desgaste genera alteraciones morfológicas y funcionales. Por otro lado, existen lesiones que puede ocurrir debido a factores genéticos, metabólicos y traumáticos (Vaca-González y cols., 2017).

Hay tres tipos de lesiones que afectan a la integridad del cartílago. Por un lado, aquellas que deterioran la MEC y la función de los condrocitos. Dependiendo de la intensidad de la lesión, este daño puede ser revertido por la propia capacidad que tienen los condrocitos de remodelar la MEC y de sintetizar nuevos compuestos. En segundo lugar, están aquellas alteraciones que generan fisuras en la superficie del cartílago y, por último, las que afectan a todo el espesor (Vaca-González y cols., 2017).

Entre las patologías que afectan al cartílago articular se encuentran la osteoartritis, la artritis reumatoide, las microfracturas y los defectos osteocondrales.

### II.3.1 Osteoartritis (OA)

La OA es la enfermedad más común de las patologías crónicas que afecta al cartílago articular, así como al resto de los componentes de la articulación (Hunter y Felson, 2006). Se caracteriza por una destrucción lenta y gradual del cartílago que recubre la superficie articular de las caderas, rodillas, manos, hombros, tobillos y columna vertebral (Felson, 2000). Clínicamente la OA se caracteriza por dolor en la articulación, limitación de movimiento, anquilosamiento después de periodos de inmovilización y diferentes grados de inflamación. La OA es un proceso degenerativo asociado a la característica ausencia de vasos del cartílago (Loeser, 2012; Pereira y cols., 2015).

Los principales factores de riesgo incluyen la edad (personas de edad avanzada), género (mujeres a partir de los 45 años), una biomecánica anormal, predisposición genética y obesidad (Loeser, 2012).

Un estudio epidemiológico llevado a cabo en Estados Unidos durante el periodo de 2007-2009 señala que el 22% de los adultos fueron diagnosticados con alguna de las formas de artritis (Centers for Disease and Control Prevention, 2010), y que la OA afecta a una de cada cinco personas mayores de 45 años y a la mitad de la población a partir de los 65 años. Estudios recientes realizados en la población española sobre la prevalencia de la OA en la rodilla, estimaron que el 23,9% de la población a partir de los 40 años de edad sufren esta patología, siendo además más común en las mujeres (Rodríguez, 2017).

La enfermedad osteoarticular supone un impacto importante sobre el estado de salud y sobre la utilización de los servicios sanitarios. El estudio ARtRoCad, elaborado por la Sociedad Española de Reumatología (SER) y la Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria (SEMERGEN) sobre la utilización de recursos sanitarios y la repercusión socioeconómica de la OA de rodilla y cadera en España, revela que la OA supone un coste de 4.738 millones de euros al año para la administración. Este dato equivale al 0,5 % del PIB nacional. De hecho, se ha estimado que el coste anual medio del tratamiento de la artrosis de rodilla y cadera en España asciende a 1.502 euros por paciente (Loza y cols., 2009).

- *Moléculas implicadas en el desarrollo de la OA*

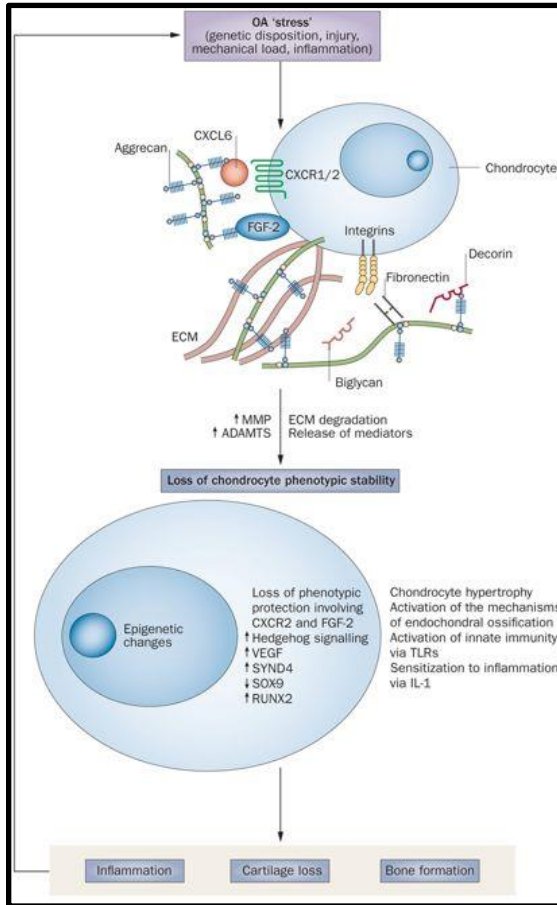
Los procesos claves iniciales que desencadenan la OA no se conocen en su totalidad, aunque hay diferentes factores individuales que promueven el desarrollo de la enfermedad (Zhai y cols., 2009; Conaghan, 2013; Wluka y cols., 2013).

Entre los mecanismos y moléculas implicadas en la lesión del cartílago asociada a la OA, se encuentra un desequilibrio en la producción de MMPs que desencadena la destrucción del cartílago (Yang y cols., 2017), destacando las MMP-3, MMP-13 y la MMP-14 ó MT1-MMP (Pap y Korb-Pap, 2015), y las agreganasas ADAMTS-4 y ADAMTS-5 (ADAMTS, del inglés *a desintegrin metalloproteinase with thrombospondin motifs*) (Yang y cols., 2017).

Se ha observado que tanto la MMP-13 como la ADAMTS-4 son inducidas por citoquinas inflamatorias y catabólicas como IL-1 (Pap y Korb-Pap, 2015; Adler y cols., 2017) y, en el caso concreto de la MMP-13, por el factor inducible por hipoxia  $2\alpha$  (HIF- $2\alpha$ , del inglés *hipoxia-inducible factor 2 $\alpha$* ) (Hirata y cols., 2012). La especificidad que tiene la MMP-13 por el agregano y por los colágenos fibrilares, entre los que se incluye el colágeno tipo II, es una de las principales causas del daño ocasionado en el cartílago.

De la misma manera, el sindecan-4 (SYND4) es un proteoglicano heparán-sulfato transmembrana que se expresa en condrocitos hipertróficos durante el desarrollo embrionario y está también expresado durante la OA, regulando la actividad de ADAMTS-5 (Wang y cols., 2011). Algunos estudios demuestran que la degradación de SYND4 evita el desarrollo de enfermedades del tipo de la OA (Echtermeyer y cols., 2009). En modelos murinos, se ha observado que la inhibición de ADAMTS-4 y ADAMTS-5 también bloquea la destrucción del cartílago y da lugar a una reducción sustancial de la severidad de OA.

La figura 8 muestra un esquema de la interacción entre la matriz del cartílago y los condrocitos durante el proceso degenerativo de la OA y las moléculas implicadas. Durante esta patología, diferentes estímulos de estrés, como la carga mecánica, influyen en la pérdida de la estabilidad fenotípica de los condrocitos, en la degradación de la MEC y en la presencia de un estado proinflamatorio.



**Figura 8:** Esquema de la interacción entre la matriz del cartílago y los condrocitos en la OA. En esta patología, diferentes estímulos de estrés provocan la degradación de la MEC, con la consecuente pérdida de proteoglicano y liberación de moléculas solubles que se unen a la MEC (como CXCL6 y FGF-2). Estas modificaciones producen una alteración fenotípica en el condrocito que suponen la pérdida de homeostasis, activación innata de inmunidad y un aumento de las interacciones célula-matriz. Los factores que se liberan por parte del cartílago contribuyen a una inflamación local, perpetuando la enfermedad y, como consecuencia, hay una pérdida de cartilago y remodelación ósea. La imagen ha sido tomada de Pap y Korb-Pap, 2015.

- *Estabilidad fenotípica de los condrocitos*

La implicación del estado de diferenciación de los condrocitos como posible causa de la OA ha tenido cierta controversia. Así, estudios recientes indican que la pérdida de la estabilidad fenotípica de los condrocitos articulares puede constituir un primer paso en el desarrollo de la enfermedad (Sherwood y cols., 2014).



Como se ha comentado anteriormente, entre los factores que regulan la diferenciación condrogénica se encuentra el factor de transcripción SOX-9. Este factor de transcripción no solo está implicado en los estadios iniciales de la condrogénesis, sino también estrechamente relacionado con la función de los condrocitos de la placa de crecimiento y del cartílago articular adulto. SOX-9 es necesario para la correcta formación de la placa de crecimiento e inhibe la progresión de los condrocitos hacia la hipertrofia, así como la evolución hacia un fenotipo osteoblástico (Dy y *cols.*, 2012).

Aunque no se conoce el papel específico que desempeña SOX-9 en la OA, se ha observado que la expresión de SOX-9 es elevada en el cartílago articular sano, mientras que la expresión de su mRNA disminuye en el cartílago osteoartrítico (Lee e Im, 2011). En este sentido, otros estudios han demostrado que la sobreexpresión de SOX-9 en condrocitos osteoartríticos permite recuperar características importantes de su fenotipo normal (Tao y *cols.*, 2016).

Aunque estos estudios relacionan la reducción de la expresión de SOX-9 con la OA, su pérdida no es suficiente para inducir un fenotipo del tipo osteoartrítico. La reducción de SOX-9 en la OA está también producida por la matrilina-3, que es una proteína de la MEC que contiene los dominios A del factor de von Willebrand. Se ha observado que esta proteína actúa como regulador del fenotipo condrocítico y está sobreexpresada en la OA (Pullig y *cols.*, 2002), reduciendo la expresión del mRNA de SOX-9 (Vincourt y *cols.*, 2008).

Otro factor soluble que protege la integridad del cartílago es el FGF-2, que se une a la matriz del cartílago en la placa de crecimiento (Chintala y *cols.*, 1994) así como al cartílago articular adulto (Vincent y *cols.*, 2007), actuando como un condroprotector endógeno mediante la inhibición de la expresión de ADAMTS-5 (Chia y *cols.*, 2009).

- *Proceso inflamatorio en la OA*

Los mediadores de la inflamación pueden afectar al metabolismo de los condrocitos y ocasionar cambios en el fenotipo de estas células, que adquieren un fenotipo hipertrófico contribuyendo así a la destrucción del cartílago y a la remodelación ósea (Berenbaum, 2013). De esta manera, las citoquinas inflamatorias, como IL-1 e IL-6, promueven el desarrollo de la OA, habiéndose demostrado la correlación entre los niveles de estas citoquinas en el suero y el daño producido en el cartílago osteoartrítico.

Por otro lado, se ha observado que los receptores del tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*), como los receptores TLR2 y TLR4, están presentes en niveles elevados en los condrocitos durante la OA (Kim y cols., 2006). Recientemente, se ha observado que dichos niveles son diferentes en función de la articulación en la que se encuentren (Hingert y cols., 2017).

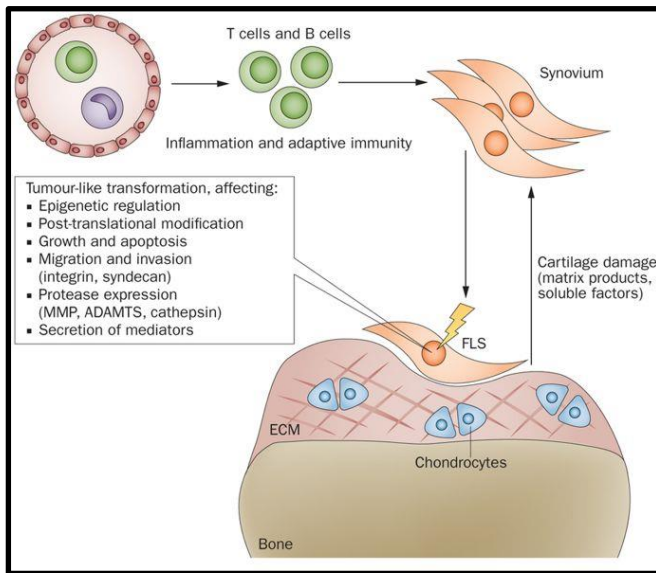
### II.3.2 Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria, crónica y frecuente de las articulaciones. Se trata de un proceso proliferativo que afecta a la membrana sinovial y que conduce a la erosión del cartílago articular y la destrucción del hueso subyacente.

En los estadios iniciales de la enfermedad, hay una activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> por un antígeno desconocido. Estos linfocitos activados estimulan la síntesis del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , del inglés *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) y las interleucinas 2 (IL-2), 6 (IL-6) y 15 (IL-15), así como la secreción de colagenasa y MMPs por parte de los monocitos, los macrófagos y las células sinoviales similares a los fibroblastos (FLS, del inglés *fibroblast-like synoviocytes*) (Kierszenbaum y Tres, 2016).

TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 son tres citocinas claves que modulan la inflamación en la artritis reumatoide. El TNF- $\alpha$  y la IL-1 están presentes en el líquido sinovial de los pacientes afectados por esta enfermedad y ambas moléculas estimulan la liberación de MMPs por parte de los FLS, destruyendo el cartílago y el hueso. Entre los MMPS, la MT1-MMP (MMP-

14) desempeña un papel clave en la destrucción del cartílago en la artritis reumatoide (Sabeh y cols., 2010). Al igual que ocurre en la OA, las ADAMTS-4, ADAMTS-5 y las catepsinas también están implicadas en el desarrollo de esta patología articular (Pap y Korb-Pap, 2015; Figura 9).



**Figura 9:** Esquema de la respuesta del tejido y de los FLS en la artritis reumatoide. En el desarrollo inicial de la enfermedad, se liberan productos de la matriz (fragmentos de proteoglicanos y proteoglicanos pequeños bioactivos) y factores solubles que se unen a los componentes de la MEC. Cuando los FLS están activados degradan progresivamente el cartílago y contribuyen a la activación y diferenciación de células adyacentes como la diferenciación de monocitos y macrófagos a osteoclastos. La imagen ha sido tomada de Pap y Korb-Pap, 2015.

### II.3.3 Otras patologías articulares

Otras patologías con una incidencia menor que la OA son las microfracturas y los defectos condrales y osteocondrales. Estas patologías causan dolor, inflamación, limitación del movimiento, fragmentación y, en casos extremos, fractura de las articulaciones (Buckwalter, 2002; Nestic y cols., 2006; Vaca-González y cols., 2017).

Las **microfracturas** en el cartílago producen daños en la red de colágeno, dando lugar a una pérdida de proteoglicanos en la superficie y alteración de la distribución de la

carga en la matriz. Debido a esta pérdida de los proteoglucanos, se produce una respuesta metabólica anormal en los condrocitos que, a su vez, hace que haya una mayor pérdida de proteoglucanos, con el consiguiente desgaste y progresión de las fisuras (Makris y cols., 2016).

Por otro lado, los defectos condrales son lesiones macroscópicas visibles mediante endoscopia y, generalmente, son consecuencia de un trauma o de la degeneración de una microfractura previa. La actividad metabólica intrínseca después de la lesión es insuficiente para que se produzca una correcta reparación y, como resultado, se origina una progresiva fisura subcondral. Este tipo de fisuras se extienden hacia zonas más profundas del cartílago, atraviesan la marca de marea y penetran en el hueso, lo que provoca un sangrado. Vehiculizadas por la sangre, las MSCs migran hacia el cartílago y generan un nuevo tejido cicatricial que se asemeja al fibrocartílago.

### **II.4 TERAPIAS DIRIGIDAS A LA REGENERACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR**

El tratamiento adecuado para reparar lesiones de cartílago sigue siendo un desafío clínico a pesar de los avances en el diseño de los fármacos para aliviar el dolor y reducir la inflamación, así como los alcanzados en procedimientos quirúrgicos (Dubey y cols., 2018).

Las principales técnicas terapéuticas empleadas en la actualidad para la regeneración/reparación del cartílago incluyen la microfractura, la implantación de condrocitos autólogos (ICA), injertos osteocondrales autólogos/aloinjertos y la inoculación de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF, del inglés *Plasma Rich in Growth Factors*).

#### **II.4.1 Inducción de la microfractura**

La inducción de microfractura es una técnica regenerativa que permite a las MSCs del hueso subcondral acceder a la zona lesionada para iniciar la reparación del cartílago

(Erggelet y Vavken, 2016). Este procedimiento es mínimamente invasivo, tiene un coste relativamente bajo y se usa como primer tratamiento en pacientes que presentan lesiones pequeñas del cartílago articular que no superen los 2 cm<sup>2</sup> (Mollon y cols., 2013). En una cirugía simple se retira el cartílago defectuoso, se perfora el hueso subcondral para permitir que las MSCs migren a la zona afectada y se diferencien hacia condrocitos del cartílago articular.

Sin embargo, el tejido que se forma es fibrocartilaginoso, compuesto principalmente por colágeno tipo I y cuyas propiedades mecánicas difieren de las del cartílago hialino original (Akman y cols., 2017). Además, esta técnica requiere un postoperatorio largo, en el que la carga mecánica que puede soportar la articulación se ve limitada hasta que el fibrocartílago se remodela y da lugar a un tejido con características que muestran mayor similitud con el cartílago hialino (Steadman y cols., 2003). Algunos estudios de seguimiento muestran que la funcionalidad de la articulación no mejora transcurrido un año de la intervención. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la eficacia de este tratamiento depende también de otros factores como la edad del paciente y el tamaño del daño inicial (Bark, 2014).

#### **II.4.2 Implantación de condrocitos autólogos (ICA)**

La ICA es una alternativa terapéutica basada en la utilización de condrocitos, que fue desarrollada por primera vez en un modelo experimental con conejos (Grande y cols., 1989), y que ofrece una reparación más eficiente de los defectos focales del cartílago articular.

Este método terapéutico consta de dos fases, una artroscopia inicial y una fase quirúrgica posterior. En la primera fase, se obtiene una biopsia de cartílago sano (200-300 mg) de una zona de carga mecánica mínima. Este tejido se digiere enzimáticamente para el aislamiento de los condrocitos, que posteriormente se expanden *in vitro* hasta conseguir un mínimo de 10<sup>7</sup> células.

A continuación, la fase quirúrgica se realiza 2 o 3 semanas después de la biopsia. En primer lugar, se retira la zona dañada y, posteriormente, se inyecta la suspensión celular generada *in vitro*. Para evitar derrame e inflamación, se coloca un parche de periostio para cubrir la superficie perforada de manera que ésta quede sellada (Brittberg y cols., 1994; Bhosale y Richardson, 2008). Desde hace unos años, el parche perióstico es sustituido por colágeno sintético con el objetivo de reducir el número de pacientes que requieren una segunda intervención por hipertrofia del parche (Gomoll y cols., 2009).

A partir de la ICA, se han ido desarrollado otros métodos como la implantación de condrocitos autólogos asociados a matriz (MACI, del inglés *matrix-associated autologous chondrocyte implantation*; Goyal y cols., 2013). En este caso, de forma similar a lo que se lleva a cabo con la ingeniería tisular (IT), se utilizan condrocitos autólogos expandidos y sembrados sobre diferentes tipos de *scaffolds*, que imitan las propiedades mecánicas de la matriz del cartílago articular nativo y sirven de soporte a las células (Medvedeva y cols., 2018)

Actualmente se encuentran disponibles diversos productos comerciales, principalmente compuestos por condrocitos autólogos sembrados sobre diferentes *scaffolds*, formados por *i)* bicapas de colágeno tipo I/III, *ii)* *scaffolds* de origen bovino de colágeno tipo I (NeoCart®), *iii)* bicapa de esponjas de colágeno tipo I que contienen condroitin sulfato (NOVOCART® 3D). Los resultados de los ensayos clínicos de fase I y II muestran una mejoría en el dolor y la movilidad articular en comparación con la técnica de la microfractura. Sin embargo, entre el 20-27% de los pacientes a los que se les trató con NOVOCART® sufrió una hipertrofia condrocítica del injerto.

Hasta el año 2013 se comercializaron microfibras compuestas de ácido hialurónico (Hyalograft® C) e hidrogeles de agarosa y alginato (Cartipatch®). Sin embargo, estos productos dejaron de comercializarse debido a una degradación muy rápida de la matriz de ácido hialurónico, a la baja calidad del cartílago formado y a la falta de estudios clínicos randomizados en fase III.

Asimismo, también se comercializan esferoides de condrocitos autólogos libres de *scaffolds* (Chondrosphere®) y discos de neocartílago compuestos de condrocitos alogénicos juveniles (RevaFlex™) (Huang y cols., 2016; Medvedeva y cols., 2018). Ambos productos han mostrado mejores resultados en comparación con los de la microfractura, pero actualmente, hay pocos ensayos clínicos de fase I y II publicados, aunque está previsto que a mediados del año 2019 finalice un ensayo clínico en fase II.

### II.4.3 Injertos osteocondrales autólogos/aloinjertos

Los injertos osteocondrales incluyen el trasplante de todo el grosor del cartílago, incluyendo el hueso subcondral. Se realiza una biopsia de 12 a 15 mm de profundidad cogiendo parte del hueso subcondral, bien del propio paciente (autólogo) o de un donante (aloinjerto). Antes de introducir el injerto, el área dañada se prepara creando un túnel y dejando únicamente la parte sana del cartílago (Díaz-Prado y cols., 2011).

- *Autoinjertos*

Los injertos osteocondrales autólogos surgieron como una alternativa a las técnicas que daban lugar a la formación de un fibrocartílago, como es el caso de la microfractura (Bobic, 1999). Estos injertos están indicados para pequeñas lesiones, menores a 2 cm de diámetro, que tienen afectado todo el grosor condral. Una de las mayores desventajas que presenta esta técnica es la procedencia del tejido implantado, puesto que proviene de una zona de baja carga, con un grosor fino, y, por tanto, presenta una menor capacidad de absorción de cargas (Díaz-Prado y cols., 2011).

- *Aloinjertos*

El empleo de aloinjertos supone un cierto riesgo en términos de inmunogenicidad y transmisión de enfermedades. Sin embargo, la utilización de tejidos procedentes de

donantes, en contraste a los autoinjertos, supone un gran beneficio debido al tamaño ilimitado del defecto que se puede reparar (2-3 cm<sup>2</sup>) (Torrie y cols., 2015). Los primeros aloinjertos fueron realizados por Gross y cols., para la reparación de la articulación de la rodilla, utilizando tejido fresco (Gross, 1975). Más adelante se recurrió a aloinjertos criopreservados, pero surgieron problemas asociados a degeneración de la MEC debida a la reducción de la viabilidad de los condrocitos.

Aunque la evaluación de los primeros 100 pacientes tratados con aloinjertos mostró que solo el 56% experimentó buenos resultados transcurridos 4 años desde la implantación, con el tiempo, las mejoras en las técnicas quirúrgicas, los tratamientos postoperatorios, una mejor selección de pacientes y la preservación de los aloinjertos han permitido que los resultados de esta terapia hayan mejorado. Así, una evaluación reciente mostró que transcurridos 12 años desde el implante, el 86% de los pacientes experimentó buenos o excelentes resultados (Chahal y cols., 2013).

### **II.4.4 Inoculación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF)**

El uso del PRGF en inyecciones intraarticulares es un tratamiento biológico innovador de la OA. El PRGF es un producto endógeno, derivado de la sangre, que contiene factores de crecimiento, citoquinas y morfógenos plaquetarios, así como fibrinógeno y otras proteínas plasmáticas. Todo ello se conforma en un agregado biológico en equilibrio (Anitua y cols., 2013) que se administra directamente mediante inyecciones en la articulación, o aplicado mediante matrices de colágeno que proporcionan una consistencia de tipo gel (Shahid y Kundra, 2017).

Las plaquetas juegan un papel crucial en la morfogénesis post-embionaria. Inducen la liberación de factores de crecimiento y citoquinas que desencadenan mecanismos para la reconstrucción de estructuras y para la restauración funcional. Entre estos mecanismos se incluyen la estimulación de la migración y la proliferación celular, la regulación de la angiogénesis, la quimiotaxis de los progenitores celulares circulantes y la orientación del tejido en la remodelación tisular (Akeda y cols., 2006; Cugat y cols., 2015).



Además de los factores del crecimiento, el PRGF proporciona un *scaffold* biológico de fibrina, procedente del fibrinógeno, que regula la coagulación, la respuesta inflamatoria y la regeneración tisular (Anitua y cols., 2013). Como consecuencia de la infiltración intraarticular de PRGF, se forma una red tridimensional de MEC (fibrina) que contiene lugares para la adhesión celular. Además, sirve como soporte mecánico y proporciona unas condiciones microambientales favorables para la reparación biológica (Nurden, 2011).

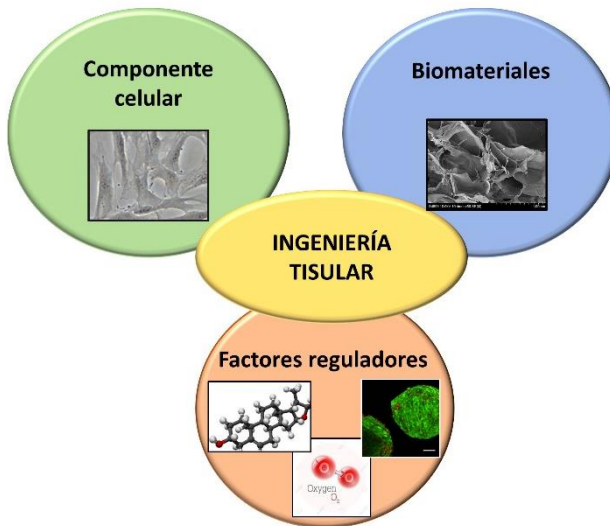
La aplicación de PRGF para el tratamiento de la OA tiene como objetivo simular el proceso biológico de regeneración tisular basado en la influencia de los factores de crecimiento sobre el tejido articular de la misma forma en la que lo hacen durante el desarrollo embrionario y la homeostasis del cartílago articular (Goldring y Goldring, 2006). De hecho, el PRGF produce un incremento en la síntesis de proteoglicanos y colágeno. Entre los factores de crecimiento presentes, se encuentra el TGF- $\beta$ 1, la trombospondina-1 y el IGF que tienen como función tratar las lesiones sintomáticas del cartílago (Shahid y Kundra, 2017).

Debido a su naturaleza autóloga, biocompatibilidad, capacidad de reabsorción y a la ausencia de leucocitos y eritrocitos, los *scaffolds* compuestos de PRGF parecen constituir materiales adecuados para el tratamiento de las lesiones condrales mediante técnicas de ingeniería tisular. Los resultados muestran una reducción significativa del dolor y la rigidez de la rodilla y una mejoría en la función física en pacientes osteoarthríticos, aunque se requiere un número mayor de estudios para corroborar dichos efectos positivos (Anitua y cols, 2013; Mellado-López y cols., 2017).

#### **II.4.5 Ingeniería Tisular (IT) del cartílago**

La IT se presenta como una opción terapéutica prometedora para la reparación de lesiones condrales que afectan específicamente al cartílago articular. Se trata de desarrollar constructos *in vitro* formados por células y *scaffolds* que tengan unas

características tanto mecánicas como biológicas similares del cartílago maduro. La idoneidad de esta opción terapéutica depende del componente celular, del biomaterial que sirva de soporte físico y trófico para la construcción del injerto y del sistema de señales que regulen la función celular (Figura 10).



**Figura 10:** Elementos fundamentales de la Ingeniería Tisular.

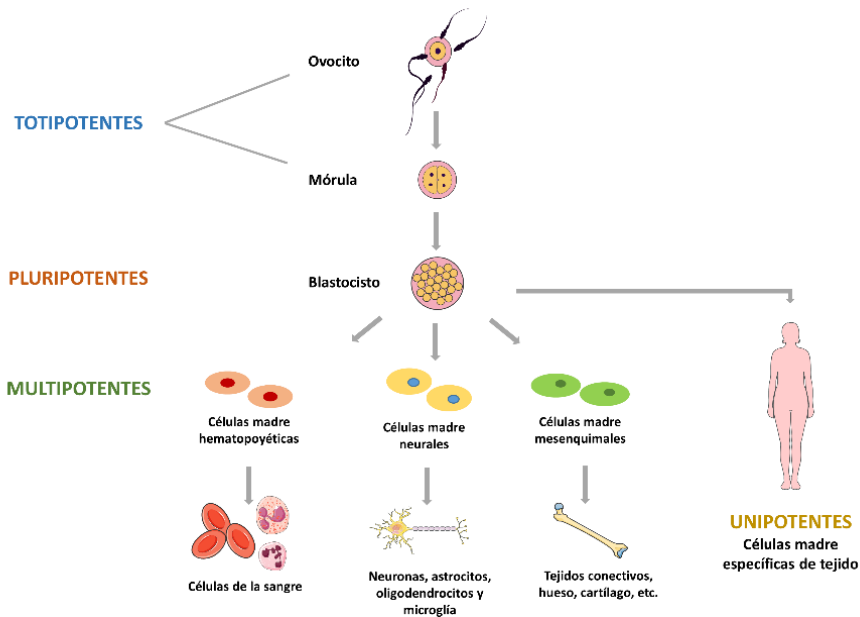
Como se ha comentado anteriormente, el cartílago es un tejido con baja densidad celular (condrocitos) y gran cantidad de MEC, compuesta principalmente por colágeno tipo II, agreganos, y agua.

### II.4.5.1 Componente celular

Uno de los tipos celulares más utilizados en terapias dirigidas al tratamiento de lesiones condrales son los condrocitos. Sin embargo, estas células presentan una serie de limitaciones como es la poca disponibilidad celular de la zona donante y la formación de un fibrocartílago que ocurre debido a una desdiferenciación de los condrocitos durante la expansión *in vitro* (Goyal y cols., 2013).

Como alternativa a la utilización de condrocitos se plantea el uso de células madre. Para que una célula sea clasificada como célula madre debe cumplir dos condiciones fundamentales. En primer lugar, la célula debe tener la propiedad de auto-renovación. Esto significa que tiene la capacidad de preservar el estado desdiferenciado después de numerosos ciclos de división celular. En segundo lugar, debe cumplir el criterio de plasticidad, que hace referencia a la capacidad de diferenciarse, adoptando la expresión de un perfil genético que con el tiempo conduzca hacia un fenotipo celular específico (Gálvez y cols., 2011).

Las células madre se clasifican en cuatro grupos según su capacidad de diferenciación en: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes, siendo las más estudiadas para su aplicación clínica las células madre pluripotentes y multipotentes (Figura 11).



**Figura 11:** Esquema representativo de la clasificación de las células madre en función de su potencialidad para diferenciarse a distintos linajes celulares.

- *Células madre totipotentes*

Las células madre totipotentes son las más indiferenciadas y se encuentran al inicio del desarrollo embrionario. El ovocito fecundado y las células de las dos primeras divisiones presentan células madre totipotentes y tienen la potencialidad de diferenciarse en todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios, formando así el embrión, la placenta y el cordón umbilical.

- *Células madre pluripotentes*

Las células madre pluripotentes fueron aisladas por primera vez en 1998 por Thomson de la masa celular del blastocisto (Thomson y cols., 1998) y se conocen con el nombre de células madre embrionarias humanas (**hESCs**, del inglés *embryonic stem cells*). Estudios más recientes muestran que tanto la mórula como los blastómeros pueden constituir una fuente alternativa de hESCs (Klimanskaya y cols., 2006). Dada su alta plasticidad, las hESCs pueden diferenciarse en las tres capas germinales, dando lugar a cualquier tipo de célula que forma un organismo. La utilización de las hESCs presenta importantes desventajas relacionadas con el problema ético planteado por la necesidad de destruir el embrión y la falta de seguridad en su uso por la formación de teratomas (Lo y Parham, 2009).

Como alternativa, en el año 2006 Takahashi y Yamanaka fueron los primeros en reprogramar fibroblastos dérmicos humanos en células madre pluripotentes, a través de una transducción de genes (Takahashi y Yamanaka., 2006). Las **iPSCs** (del inglés *induced pluripotent stem cells*) son células madre pluripotentes inducidas obtenidas a partir de células somáticas que poseen la capacidad de diferenciarse en células originarias de las tres capas germinales (Zomer y cols., 2015). Diversos estudios demuestran que se pueden obtener miocitos (Citro y cols., 2014), neuronas (Wheeler y cols., 2015), islotes pancreáticos (Kuisse y cols., 2014) o condrocitos (Cheng y cols., 2014). De este modo, este tipo celular brinda nuevas oportunidades terapéuticas en el campo de la medicina,

pudiendo resultar como una alternativa importante a considerar en el tratamiento de la OA (Castro-Viñuelas y cols., 2018).

- *Células madre multipotentes*

Las células madre multipotentes se encuentran en la mayoría de los tejidos y se diferencian en células de una única capa germinal. Se pueden obtener del feto (hFSCs, del inglés *human fetal stem cells*) y de una gran variedad de tejidos como la médula ósea y sangre periférica (HSCs, del inglés *hematopoietic stem cells*), el tejido adiposo (ASCs; del inglés *adipose stem cells*), el tejido nervioso, la gelatina de Wharton. Entre ellas, las células madre de origen mesenquimal han sido ampliamente estudiadas y propuestas para su utilización en IT.

Las **hFSCs** se presentan como una alternativa a los problemas éticos derivados de la utilización de las hESCs. Las hFSCs se pueden obtener tanto de fuentes prenatales como postnatales (Klimanskaya y cols., 2006). Las fuentes prenatales de hFSCs incluyen la sangre fetal del cordón umbilical y del líquido amniótico. Así, del cordón umbilical se pueden aislar células madre fetales hematopoyéticas (hFSCs) y células madre fetales mesenquimales (Gucciardo y cols., 2009).

Las **HSCs** se aíslan de la médula ósea y de la sangre periférica (Chong y cols., 2012). Presentan los marcadores de superficie CD34, CD90 y CD133 (Nielsen y McNagny, 2009), y poseen la capacidad de diferenciarse hacia todas las células de estirpe hematopoyética.

Las **MSCs**, son células multipotentes identificadas por primera vez en la médula ósea (Friedestein, 1976) y pueden diferenciarse en los tipos celulares del linaje mesodérmico. Estas células pueden aislarse de diferentes tejidos como el tejido adiposo (Rodriguez y cols., 2005), la placenta (Fukuchi y cols., 2004), el cordón umbilical (Romanov, 2003), la pulpa dental (Gronthos y cols., 2007), los tendones (Bi y cols., 2007) y el hueso trabecular (Nöth y cols., 2002). A pesar de que su número decrece con la edad, su potencial para expandirse *ex vivo* permite conseguir una cantidad suficiente para su uso terapéutico (Ullah y cols., 2015).

Las MSCs difieren entre sí en la expresión de marcadores de superficie y en su capacidad funcional tras haber sido estimuladas con mediadores proinflamatorios. Por ello, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISTC) propone tres criterios mínimos para definir las MSCs (Dominici y cols., 2006):

- Deben ser adherentes en condiciones de cultivo celular estándar.
- Deben expresar los marcadores CD105, CD73 y CD90 y no expresar los CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79 $\alpha$ , además de expresar el antígeno leucocitario humano HLA-DR.
- Deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteocitos, adipocitos y condrocitos.

Las MSCs desempeñan un papel crucial en la homeostasis de los tejidos y órganos y en el mantenimiento del nicho de células madre, debido principalmente al ya mencionado potencial para diferenciarse en varios tipos celulares y a la secreción de numerosos factores de crecimiento (Tolar y cols., 2010). La capacidad regenerativa y reparadora de las MSCs está mediada por un doble mecanismo: la interacción directa célula-célula a través de sus receptores de membrana y, la acción indirecta ejercida por factores solubles (efecto paracrino) (Kokai y cols., 2014; Klimczak y Kozłowska, 2016; Guadix y cols., 2017).

Estas células, a pesar de presentar menor potencial proliferativo y de diferenciación en comparación con las células madre embrionarias, se obtienen con mayor facilidad de los tejidos, no crean problemas éticos (Trounson y McDonald, 2015), presentan una alta capacidad de expansión *in vitro* y suponen un bajo riesgo de formación de teratomas (Bieback y Brinkmann, 2010; Gálvez, 2014).

Por otro lado, expandirse rápidamente *in vitro* y diferenciarse hacia condrocitos en presencia de los factores de crecimiento y transcripción apropiados (Islam y cols., 2016; Calabrese y cols., 2017). Además, las MSCs pueden modular el sistema inmunitario, disminuir la inflamación y participar en la cicatrización de heridas debido a sus propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y paracrinas (Kokai y cols., 2014). A

partir de los resultados obtenidos, se han propuesto estas células como una alternativa terapéutica prometedora para el tratamiento de distintas enfermedades, como la diabetes (Marappagounder y cols., 2013), la esclerosis múltiple (Cohen y cols., 2018) y también las lesiones de hueso y cartílago (Reissis y cols., 2016; Dubey y cols., 2018), entre otras.

Debido a todas las propiedades mencionadas, las MSCs han sido aprobadas por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) y la Agencia Europea del Medicamento (AEM) para el tratamiento de diversas patologías. De acuerdo con los datos recogidos en la base de datos *clinicaltrials.gov* a 26 de octubre de 2018, actualmente se están llevando a cabo 705 ensayos clínicos con MSCs en distintas enfermedades. De estos ensayos clínicos, 17 estudian el efecto terapéutico de las MSCs en la reparación del cartílago, dando como resultado la regeneración del cartílago en presencia de colágeno tipo II (Reissis y cols., 2016).

- *Células madre derivadas de tejido adiposo (ASCs)*

En las últimas décadas se ha considerado al tejido adiposo como una de las principales fuentes (Wang y cols., 2015).

Este tejido está compuesto principalmente por los adipocitos y la fracción vascular estromal que contiene el resto de los componentes celulares (preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales, células inmunes y células madre mesenquimales) (Makridakis y cols., 2013).

Las **ASCs** se aislaron por primera vez en 2001 (Zuk y cols., 2001). Presentan algunas ventajas con respecto a las MSCs derivadas de la médula ósea, como son su mayor capacidad proliferativa (Schubert y cols., 2011), mayor secreción de factores de crecimiento relacionados con la diferenciación condrogénica (IGF, bFGF and TGF- $\beta$ 1) (Li y cols., 2015), mayores propiedades anti-inflamatorias (Hao y cols., 2017) y mayor estabilidad en el proceso de diferenciación (Izadpanah y cols., 2006; Strioga y cols., 2012). Además, muestran una mayor facilidad de aislamiento y la posibilidad de obtener grandes cantidades de células mediante procedimientos mínimamente invasivos (Vériter y cols.,

2015). Al igual que las MSCs, las ASCs también tienen la capacidad de diferenciarse en osteocitos, adipocitos y condrocitos (Wang y cols., 2015).

La administración de ASCs para el tratamiento de lesiones condrales incluye métodos como las inyecciones intraarticulares de suspensiones celulares o el uso de *scaffolds* biológicos como plataformas vehiculares para dichas células. La inyección intraarticular ha sido más comúnmente realizada y estudiada con resultados alentadores en animales (Ter Huurne y cols., 2012). Sin embargo, Vilar y cols. demostraron que aunque las inyecciones de suspensiones de ASCs eran eficaces en el tratamiento de los defectos del cartílago, las mejoras significativas en el soporte de carga del cartílago disminuyeron gradualmente después de 3 meses (Vilar y cols., 2014). Este efecto transitorio sugiere que las ASC inyectadas no pueden integrarse de manera adecuada en el tejido del huésped y requieren de un *scaffold* biológico que sirva de soporte para las células.

- *Células madre unipotentes*

Las células madre unipotentes pueden diferenciarse únicamente a un tipo celular específico. La capacidad de reparación de un tejido después de sufrir un daño, reside en las células madre del propio tejido que dan lugar a células diferenciadas. Estas células permanecen en un estado quiescente hasta que los estímulos locales activan su proliferación, diferenciación y migración. En este grupo se incluyen las células madre musculares, las epidérmicas y las del resto de epitelios de revestimiento.

### **II.4.5.2 Factores reguladores de la diferenciación condrogénica**

Además de las células y los biomateriales que componen el constructo de IT, hay una serie de parámetros clave que regulan la diferenciación condrogénica y determinan en gran medida la idoneidad del mismo. Entre estos factores reguladores se incluyen la formación de agregados celulares tridimensionales (cultivos 3D), la baja tensión de



oxígeno (hipoxia) y un sistema de señales químicas que induzcan dicha diferenciación condrogénica.

#### *II.4.5.2.1 Formación de agregados tridimensionales (3D)*

El cultivo celular en dos dimensiones (2D) o también denominado cultivo en monocapa ha sido ampliamente utilizado en biología celular. Sin embargo, este tipo de cultivo altera el fenotipo (Pittenger y cols., 1987; Mitchell y cols., 2006), el comportamiento celular (Shearier y cols., 2015) y no refleja con fidelidad el microambiente del tejido *in vivo*. En el caso concreto de las células propias del cartílago, el cultivo de estas células en monocapa induce su desdiferenciación, cuya consecuencia es una reducción de la síntesis de colágeno tipo II y agreganos, así como un aumento de la producción de colágeno tipo I (Darling y Athanasiou, 2005).

Para evitar la pérdida de fenotipo condrogénico, se ha propuesto como alternativa la utilización de MSCs, que pueden diferenciarse hacia condrocitos, cultivadas en cultivos 3D. Una de las estrategias para obtener estas estructuras 3D es la formación de esferoides, constituidos por un número variable de células que forman un agregado mediante un proceso denominado autoensamblaje (Fennema y cols., 2013).

El agregado se mantiene en una estructura estable debido a la presencia de proteínas de la MEC como el colágeno, la fibronectina y la laminina, con múltiples regiones de ácido arginil glicin laspartico (RGD, del inglés arginylglycylaspartic acid) que interaccionan con las integrinas de la membrana de las células (Baptista y cols., 2018). La asociación de células entre sí, debido a la agregación inicial, provoca una sobreexpresión de las N-cadherinas en la membrana celular, dando lugar a la compactación y a la formación de esferoides (Figura 12). Este proceso de condensación celular, regulado por las interacciones célula-célula y célula-MEC, es vital para la diferenciación condrogénica (Kwon y cols., 2016).

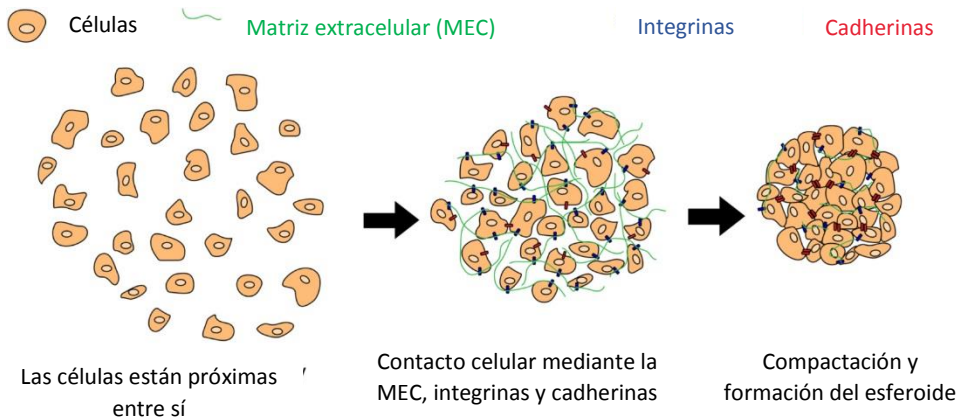
La formación de esferoides ha demostrado favorecer la capacidad regeneradora de las MSCs, promoviendo la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, proangiogénicas

y factores quimiotácticos (Bartosh y cols., 2010; Ylöstalo y cols., 2012; Cheng y cols., 2013), crear un microambiente semejante al que se encuentran *in vivo* (Bartosh y cols., 2010; Frith y cols., 2010) y promover la diferenciación condrogénica (Baptista y cols., 2018).

Las MSCs que forman los esferoides sufren cambios drásticos en su morfología, en la capacidad de adhesión y en la organización de citoesqueleto. Por un lado, las células en la superficie de los agregados presentan una morfología plana con menos uniones a las células adyacentes, lo que les permite expandirse de manera más eficiente (McBeath y cols., 2004). Por otro lado, las células en el interior presentan una morfología más redondeada (Frith y cols., 2010). Se ha sugerido que la morfología de las MSCs regula preferentemente la diferenciación directa hacia linajes específicos a través de la reorganización del citoesqueleto de actina, modulada por las vías Rho/ROCK (Gao y cols., 2010; Wang y cols., 2012). En este sentido, los cambios morfológicos también están íntimamente relacionados con la diferenciación condrogénica, donde las células del tipo condrocito se encuentran en el centro del agregado (Ichinose y cols., 2005).

El incremento de la secreción de la MEC en los agregados también promueve una señalización autocrina debido a un incremento de los factores de crecimiento locales unidos a la MEC. Como resultado, los esferoides proporcionan un nicho 3D que permite a las células interactuar con las que se encuentran alrededor y con la MEC (McMillen y Holley, 2016). De esta manera el potencial de diferenciación de las MSCs se ve significativamente aumentado por el cultivo celular en agregados (Laschke y Menger, 2017).

La formación de esferoides a partir de células condroprogenitoras es un modelo interesante para la aplicación en IT, ya que las condiciones de cultivo se asemejan en mayor medida a las condiciones *in vivo* y se promueve la expresión de genes propios del cartílago (Kabiri y cols., 2012; Stuart y cols., 2017).



**Figura 12:** Ensamblaje de la suspensión celular en un esferoide al producirse interacciones célula-célula a través de uniones ligando-receptor mediante cadherinas e integrinas, respectivamente. El agregado celular se compacta en un esferoide completamente formado con el tiempo. Figura tomada de Gionet-Gonzales y Leach, 2018.

Los esferoides de MSCs se han utilizado en diferentes modelos animales. Los principales estudios *in vivo* se han realizado para la reparación de enfermedades cardiovasculares, en cicatrización, para atenuar la respuesta inflamatoria en la colitis ulcerosa (Molendijk y cols., 2016) y en defectos osteocondrales (Petrenko y cols., 2017). En concreto, los esferoides formados por ASCs han sido utilizados para la reparación de hueso (Shen y cols., 2013) y cartílago (Winter y cols., 2003; Baptista y cols., 2018).

La generación de estos esferoides, se realiza utilizando varios métodos entre los que se incluyen el auto-ensamblaje en superficies no adherentes o en superficies tratadas, la agregación utilizando fuerzas mecánicas, la microfabricación y autoensamblaje mediante la técnica *hanging drop* (Lin y Chang, 2008; Bartosh y cols., 2010; Baraniak y Mcdevitt, 2012; Leight y cols., 2012).

Al igual que ocurre durante el desarrollo embrionario, estos métodos utilizan el confinamiento espacial o la fuerza mecánica para incrementar los contactos célula-célula y, así, controlar el tamaño del agregado (Kurosawa, 2007; Ungrin, 2008).

- *Auto-ensamblaje en superficies no adherentes o en superficies tratadas*

El auto-ensamblaje en superficies no adherentes es un método fácil, pero conduce a la formación de agregados de tamaño muy variable, con viabilidad reducida y baja eficiencia (Hildebrandt y cols., 2011). Por esta razón, se han investigado varios métodos para aumentar la eficiencia de la formación de agregados y modular la composición de los mismos, modificando las superficies de adhesión mediante el tratamiento de éstas con diferentes compuestos. Un ejemplo de ellos es el polietilenglicol; las placas tratadas con este producto promueven la homogeneidad y aumenta la viabilidad de los agregados de MSCs (Wang y cols., 2009; Miyagawa y cols., 2011). Por otro lado, el tratamiento de superficies con membranas poliacatiónicas de quitosano (CS, del inglés *chitosan*) ha sido empleado para la generación de esferoides. En este caso, las MSCs se fusionan a través de la motilidad celular no controlada, formando agregados con facilidad. Sin embargo, al igual que ocurre en el caso de las superficies no adherentes, hay una gran variabilidad en el tamaño del agregado celular que se genera (Huang y cols., 2011; Cheng y cols., 2013).

- *Auto-ensamblaje empleando fuerzas mecánicas*

Se han desarrollado varios métodos que combinan el confinamiento espacial y las fuerzas mecánicas para mejorar la eficiencia de la formación de agregados, la distribución del tamaño y la viabilidad celular (Baraniak y Mcdevitt, 2012). El uso de agitadores orbitales rotatorios o matraces giratorios generan unos esferoides heterogéneos, aumentan la viabilidad de las MSCs y mejoran el suministro de nutrientes. Sin embargo, el cultivo durante largos periodos de tiempo hace que los esferoides se fusionen entre sí y reduzcan la viabilidad de las células (Frith y cols., 2010; Hildebrandt y cols., 2011).

- *Auto-ensamblaje mediante la técnica hanging-drop*

Este método sencillo permite generar agregados celulares similares a tejidos para el estudio de las propiedades biomecánicas o el análisis molecular y bioquímico en un modelo que permite controlar la homogeneidad de los esferoides que se forman, controlando el número de células en la siembra. El *hanging-drop* no requiere de un equipo especializado y puede adaptarse para incluir cualquier agente biológico que pueda ser de interés y dilucidar, así, los efectos sobre la interacción célula-célula o célula-MEC. Este método también puede ser utilizado para co-cultivar dos o más poblaciones celulares diferentes y, estudiar el papel de las interacciones intercelulares (Foty, 2011).

Esta técnica consiste en la formación de esferoides por acción de la gravedad. Las células se siembran en gotas de 20-30  $\mu\text{L}$  en la parte interna de la tapa de una placa Petri de plástico. La densidad celular puede comprender entre 500 hasta 20.000 células, en función del estudio y del tipo celular. Posteriormente, se gira la tapa de manera que todas las gotas quedan boca abajo. En general, los esferoides están formados tras 24 horas de cultivo, aunque dependiendo del tipo celular puede requerir de más tiempo (Shri y cols., 2017).

#### II.4.5.2.2 Biodisponibilidad de oxígeno ( $\text{O}_2$ )

Las ASCs *in vivo* residen en un microambiente con una baja tensión de oxígeno (hipoxia), cuyos valores están comprendidos entre 1-5%  $\text{O}_2$  (Choi y cols., 2015) y son más bajos que la tensión atmosférica de oxígeno (normoxia, 20-21%  $\text{O}_2$ ) (Choi y cols., 2014). A pesar de residir en un nicho hipóxico, las ASCs se cultivan habitualmente en condiciones de normoxia, aunque estas condiciones no reflejan sus condiciones fisiológicas *in vivo*. Por ello, el cultivo de ASCs *in vitro* se debería realizar en condiciones de hipoxia con el objetivo de obtener unos resultados experimentales más precisos y fiables.

Varios estudios han demostrado el efecto positivo de la hipoxia en la funcionalidad de las ASCs, incluyendo su influencia en la proliferación, diferenciación, supervivencia y secreción de citoquinas y factores de crecimiento (Fotia y cols., 2015; Choi y cols., 2017). Asimismo, se ha descrito que la hipoxia reduce la diferenciación osteogénica

y adipogénica de las ASCs, mientras que promueve la diferenciación condrogénica (Buravkova y cols., 2014).

La respuesta celular a las condiciones de hipoxia está mediada por la subunidad  $\alpha$  del factor inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ; Hewitson y cols., 2007). En condiciones de hipoxia, HIF-1 $\alpha$  se transloca al núcleo donde se integra con otros componentes del complejo HIF para iniciar la transcripción de los genes diana responsables de la diferenciación condrogénica (Taheem y cols., 2018). En estas condiciones, hay una sobreexpresión del factor de transcripción SOX-9 que, a su vez, promueve la expresión de colágeno tipo II y de agreganos (Portron y cols., 2013).

Por lo tanto, HIF-1 $\alpha$  además de ser clave en la formación del cartílago articular durante el desarrollo embrionario (Schipani y cols., 2001; Provot y cols., 2007), también desempeña un papel esencial en la diferenciación condrogénica de las MSCs (Amarilio y cols., 2007; Duval y cols., 2012). Además, HIF-1 $\alpha$  es vital para el mantenimiento del fenotipo de los condrocitos diferenciados e inhibir su hipertrofia (Duval y cols., 2009).

### *II.4.5.2.3 Moléculas reguladoras de la diferenciación condrogénica*

Existen una serie de compuestos imprescindibles para inducir la condrogénesis *in vitro*, entre los que se encuentra la dexametasona, el ácido ascórbico, la insulina, la transferrina, el ácido selenoso, el sodio piruvato y el TGF- $\beta$ 3 (Tabla 1).

La **dexametasona** es un glucocorticoide sintético con propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras que tiene diferentes efectos en la proliferación y diferenciación de las MSCs. Mientras que las concentraciones más elevadas ( $10^{-6}$  M) suprimen la proliferación de las MSCs de la médula ósea (Walsh y cols., 2001), concentraciones más bajas ( $10^{-10}$  M) promueven la proliferación y expresión de genes implicados en la síntesis de componentes de la matriz cartilaginosa (colágeno tipo II y agreganos) (Derfoul y cols., 2006; Nazempour y Van Wie, 2016) y de SOX-9 (Wang y cols.,

2015). Por otro lado, la dexametasona también suprime la degradación del colágeno por inhibición de la síntesis de las MMPs.

El **ácido ascórbico** es una molécula crítica en la condrogénesis (Nazempour y cols., 2017). Esta molécula es un cofactor esencial de la prolilil-sil-hidroxilasa, un enzima clave en la biosíntesis del colágeno. Por lo tanto, una deficiencia de ácido ascórbico produce una reducción de la proliferación de los condrocitos y una síntesis defectuosa de la MEC. Además, esta molécula es necesaria para la diferenciación de diferentes tipos celulares provenientes del mesénquima, como las células condroprogenitoras (Temu y cols., 2010).

Los medios de inducción condrogénicos incluyen **transferrina** y **ácido selenoso** junto con la **insulina** en una mezcla denominada ITS (insulina-transferrina-ácido selenoso) (Liu y cols., 2014). La ITS evita la desdiferenciación de los condrocitos articulares en cultivo en monocapa y promueve la formación de un cartílago de alta calidad cuando se combina con otros factores de crecimiento como el TGF- $\beta$  (Chua y cols., 2005), regulando la proliferación y la producción de MEC por parte de los condrocitos (Mueller y cols., 2013).

El **TGF- $\beta$ 3** es otra molécula de uso común para inducir la condrogénesis *in vitro*, ya que promueve la expresión de los marcadores condrogénicos tanto en MSCs derivadas de la médula ósea como en hASCs. Al igual que ocurre con la dexametasona, los efectos de los suplementos de TGF- $\beta$  sobre la condrogénesis son dosis dependientes (Derfoul y cols., 2006; Nazempour y cols., 2017).

Además de estos compuestos básicos, hay otra serie de moléculas que se emplean como señales reguladoras de la diferenciación condrogénica, como el TGF- $\beta$ 1 (Futrega y cols., 2015), la BMP-2, la BMP-7 (Islam y cols., 2016), el IGF-1 (Liang y cols., 2018), la L-prolina (Murata y cols., 2015; Nakagawa y cols., 2016), la cartogenina y la glucosamina (Wang y cols., 2015a).

**Tabla 1:** Moléculas de señalización presentes en un medio de diferenciación condrogénico y su función (Aisenbrey y Bryant, 2016; Sun y cols., 2018).

Compuestos	Función
Dexametasona (100 nM)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Promueve la proliferación</li><li>• Promueve la síntesis de colágeno tipo II y agreganos</li></ul>
Ácido L-ascórbico 2-fosfato (50 mg/mL)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Biosíntesis de colágeno</li></ul>
Insulina (1%) Transferrina (1%) Ácido selenoso (1%)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Promueve la síntesis y regulación de MEC</li><li>• Evita la desdiferenciación de los condrocitos</li><li>• Regula la proliferación celular</li></ul>
TGF- $\beta$ 3 (2,5 ng/mL)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Promueve la expresión de marcadores propios del cartílago</li></ul>

### II.4.5.3 Biomateriales

Un biomaterial es cualquier sustancia que ha sido diseñada para interactuar con los sistemas biológicos con un propósito médico, ya sea diagnóstico o terapéutico (tratar, aumentar, reparar o reemplazar una función tisular del cuerpo; Oliveira, 2018).

Los biomateriales, utilizados como *scaffolds*, son un componente clave en la IT del cartílago y determinan en gran medida el éxito o el fracaso del constructo. De hecho, las características tanto físicas como químicas de los materiales influyen en la calidad del tejido nuevo que está en formación. Así, todos los biomateriales tienen que ser evaluados en términos de su biocompatibilidad, propiedades mecánicas y biodegradación para determinar si son adecuados para aplicaciones médicas específicas. Además de ser biocompatibles, para ser empleados en IT deben ser porosos, facilitar la adhesión celular, permitir el soporte de cargas y ser biodegradables (Puppi y cols., 2010).

La **biocompatibilidad** se refiere a características del biomaterial tales como la ausencia de efecto tóxico sobre las células, carencia de actividad mutagénica, no provocar una reacción inmunógena y permitir una adecuada integración en el tejido (Park, 2007).



La **porosidad** de un material proporciona la capacidad para absorber gases o líquidos a través de espacios vacíos del material, conocidos como poros. Esta porosidad permite la migración celular y la difusión de nutrientes, gases y productos de desecho (Park, 2007).

Otra característica importante de los biomateriales es que permita la adhesión celular. De esta manera, las células adheridas proliferan en el material cubriendo su la superficie, y permitiendo la diferenciación celular y la liberación de moléculas bioactivas.

En ciertas aplicaciones como la regeneración de hueso y de cartílago es importante que el biomaterial pueda estructural y mecánicamente soportar cargas y la deformación de la estructura sin pérdida de volumen.

Por último, la **biodegradación** se refiere a la tasa de descomposición gradual del biomaterial mediada por la actividad biológica específica, siendo una propiedad importante para los biomateriales que vayan a ser utilizados como andamiajes no permanentes, implantes temporales, suturas y vectores de liberación de fármacos (Park y Lake, 2007). Cuando el material se utiliza como *scaffold* asociado a células, la reabsorción controlada y gradual debe sincronizarse con la proliferación celular y la síntesis de la MEC del tejido.

El proceso de biodegradación se lleva a cabo por interacciones químicas, físicas y biológicas, y su velocidad de degradación, dentro de un organismo, está relacionada con las características del polímero y el lugar en el cuerpo donde será expuesto. En este sentido, la degradación química está determinada por la composición, estructura molecular, cristalinidad, superficie, características hidrofílicas o hidrofóbicas de los materiales (Park y Lake, 2007), así como por las interacciones químicas, físicas, mecánicas y biológicas entre el material y el medio ambiente circundante (Tamariz y Ríos-Ramírez, 2013).

Los biomateriales pueden ser degradados dentro del cuerpo por tres mecanismos generales: **enzimáticos**, **oxidativos** e **hidrolíticos** (Tamariz y Ríos-Ramírez, 2013).

La **degradación enzimática** mediada por lisozima es el mecanismo primario de degradación dentro del cuerpo humano (Aiba, 1992; Nordtveit y cols., 1996). La lisozima descompone los biomateriales rompiendo los enlaces glucosídicos entre las unidades de polisacáridos en el polímero. Posteriormente, los productos derivados de la degradación, como el azúcar glucosamina, se puede incorporar a los proteoglicanos o ser metabolizados por el cuerpo (Kean y Thanou, 2010). La lisozima está presente en varios tejidos del cuerpo, incluyendo el suero, en concentraciones que van de 1 a 14  $\mu\text{g/mL}$  (Porstmann y cols., 1989). Igualmente, se puede encontrar concentraciones más altas en el tejido lesionado en presencia de macrófagos o neutrófilos, ya que éstos también pueden secretar lisozima (Cohen y cols., 1982).

La **degradación hidrolítica** puede definirse como la escisión de enlaces químicos en la cadena principal del polímero por medio del agua, dando lugar a oligómeros y, finalmente, a monómeros (Azevedo y cols., 2004). La degradación hidrolítica de los enlaces glucosídicos entre las unidades de polisacáridos ocurre a un ritmo muy lento. Por este motivo, los mecanismos hidrolíticos contribuyen en menor medida a la degradación de los biomateriales (Kim y cols., 2008).

Por último, los biomateriales también pueden degradarse por **oxidación** cuando se exponen a los fluidos y tejidos corporales. Durante la respuesta inflamatoria las células inmunitarias, en particular los leucocitos y los macrófagos, producen especies de oxígeno altamente reactivas como el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el óxido nítrico (NO) y el ácido hipocloroso (HOCl). El efecto oxidativo de estas especies puede causar la escisión de las cadenas de polímeros y contribuir a su degradación (Chu, 2000; Jennings, 2016).

Los biomateriales que se utilizan en IT del cartílago, pueden ser polímeros degradables de **origen natural** o **sintéticos**.

- *Polímeros sintéticos*

Se han desarrollado una gran variedad de materiales biodegradables sintéticos para aplicaciones biomédicas y, en concreto, para la reparación de lesiones condrales. Entre estos materiales se incluye la poli( $\epsilon$ -caprolactona) (Visser y *cols.*, 2015), el poli L-ácido láctico (PLA, del inglés *poly lactic acid*), el ácido poliglicólico (PGA, del inglés *poly glycolic acid*) (Sonomoto y *cols.*, 2016), los co-polímeros de PGA/PLA (Ahmed y *cols.*, 2015), el poli-vinil alcohol (Shafiee y *cols.*, 2011), poliuretanos (Hung y *cols.*, 2014), el polietilenglicol (Cui y *cols.*, 2011; Zhang y *cols.*, 2012; Armiento y *cols.*, 2018) y el autoensamblaje de péptidos (Kisiday y *cols.*, 2002; Medvedeva y *cols.*, 2018).

Estos polímeros sintéticos tienen como ventaja su fácil procesamiento, la preservación de la esterilidad del material, unas propiedades mecánicas adecuadas y la posibilidad de controlar el tiempo de degradación alterando la estructura del material. En cambio, el carácter hidrofóbico y, en ocasiones, la formación de estructuras poco adecuadas para la adhesión celular, hacen que estos materiales sean menos apropiados que los de origen natural (Camarero-Espinosa y *cols.*, 2016).

- *Polímeros de origen natural*

Las moléculas de origen natural utilizadas para el desarrollo de biomateriales son principalmente proteínas (colágeno, gelatina, etc.) o polisacáridos (ácido hialurónico, agarosa, alginato, seda, quitina y quitosano) (Johnstone y *cols.*, 2013).

Se han estudiado diferentes tipos de colágeno como matrices para la IT del cartílago, de los cuales los más comunes son el **colágeno tipo I, II, III** y la mezcla de ellos (Parenteau-Bareil y *cols.*, 2010; Sanjurjo-Rodríguez y *cols.*, 2017). Estos materiales promueven la proliferación de los condrocitos y la formación de tejido cartilaginoso (Legendre y *cols.*, 2013). Sin embargo, los *scaffolds* basados en colágeno presentan algunas limitaciones relacionadas con un insuficiente soporte de cargas una vez implantado en la articulación (Haaparanta y *cols.*, 2014).

Por otro lado, los *scaffolds* compuestos por polisacáridos como el ácido hialurónico, agarosa, alginato y quitosano también permiten la condrogénesis y promueven la formación de cartílago hialino. El **ácido hialurónico**, presente en el cartílago, es fácilmente reconocible por los receptores de los condrocitos, permitiendo así su supervivencia (Tan y cols., 2009). No obstante, los materiales basados en ácido hialurónico, aunque estén entrecruzados, presentan propiedades mecánicas limitadas y un tiempo corto de degradación (Ouasti y cols., 2011).

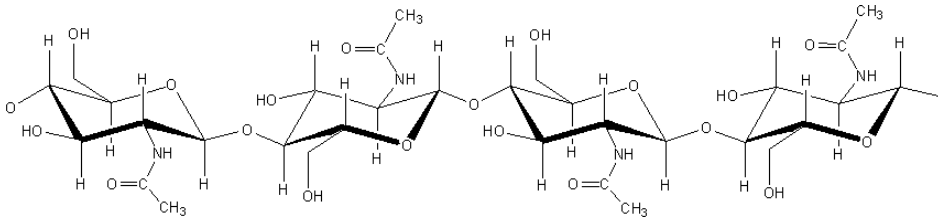
La **agarosa** y el **alginato** se extraen de las algas marinas (Müller y cols., 2011). Ambos materiales han sido ampliamente estudiados para su uso como *scaffolds* en IT del cartílago y han mostrado resultados prometedores en la proliferación de los condrocitos, en la expresión de marcadores condrogénicos (Ng y cols., 2009; Ab-Rahim y cols., 2013) (Mhanna y cols., 2014) y en la diferenciación condrogénica de las ASCs (Choi y cols., 2018). Sin embargo, tanto los geles de agarosa como de alginato presentan unas propiedades mecánicas bastante inferiores comparadas con las del cartílago (Jost y cols., 2014).

Otros polisacáridos, entre los que incluyen la **quitina** (CH, del inglés *chitin*) y el **quitosano** (CS, del inglés *chitosan*), se han propuesto como candidatos para la fabricación de biomateriales debido a su elevada disponibilidad (Yeul y Rayalu, 2013) y biocompatibilidad (Wang y cols., 2017).

### II.4.5.3.1 Quitina y quitosano

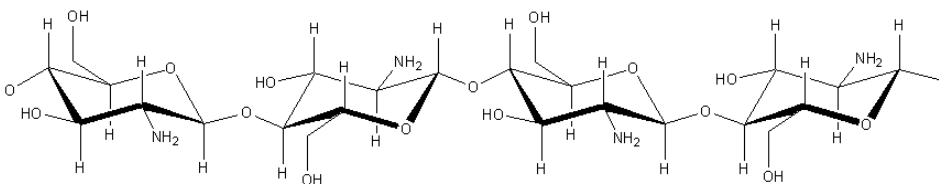
La CH es un polímero de cadena larga ampliamente distribuido y compuesto por unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina que forman uniones covalentes  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (Figura 13). Es el principal componente estructural del exoesqueleto de artrópodos como los crustáceos (por ejemplo, cangrejos, langostas, etc.) y las paredes celulares de hongos y levaduras. En su estado nativo, la CH se encuentra en forma de nanofibrillas (nanocristales y nanofibras), con excelentes propiedades, tales como su hidrofobicidad, baja densidad, reactividad y estabilidad química que, unido a las propiedades biológicas, hacen de los nanocristales y nanofibras de CH unos candidatos únicos para el desarrollo

de injertos de tejido cartilaginoso (Al-Qarni y cols., 2016). Sin embargo, a pesar de sus beneficiosas propiedades estructurales y biológicas, la falta de solubilidad en agua y en disolventes orgánicos son características que limitan el uso de la CH en aplicaciones biomédicas (Li y cols., 2016).



**Figura 13:** Estructura molecular de las unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina presentes en la quitina (Kumar, 2000).

Por otro lado, el CS es un polisacárido derivado de la N-deacetilación de la CH, que contiene más del 50% de grupos aminos libre en la estructura (Figura 14). El CS, soluble en agua y solventes orgánicos, es el biopolímero más utilizado en aplicaciones biomédicas por sus propiedades antimicrobianas y biocompatibilidad (Varoni y cols., 2017; Wu y cols., 2017). Además, la similitud estructural del CS con los GAGs, presentes en el cartílago articular, hace que sea uno de los materiales más adecuados para la IT del cartílago (Kim y cols., 2008; Armiento y cols., 2018).

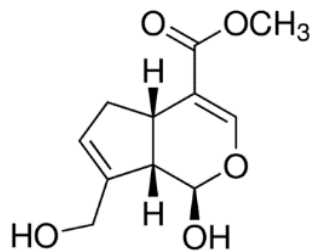


**Figura 14:** Estructura molecular del CS (Kumar, 2000).

El microambiente *in vivo* es 3D de manera que, para imitar las condiciones fisiológicas con mayor fidelidad, los materiales también deben presentar una estructura similar. Para ello, es necesario una reacción de entrecruzamiento donde las cadenas de

polímeros se fusionan mediante uniones, covalentes o no covalentes, formando estructuras 3D (Azeredo y Waldron, 2016). Tradicionalmente, se han utilizado elementos entrecruzadores químicos como el ácido algínico (Mitra y cols., 2013), compuestos fenólicos (Aewsiri y cols., 2010) y aldehídos (De Dicastillo y cols., 2016). Debido a los inconvenientes que presentan estas moléculas, como la elevada toxicidad en el caso de los aldehídos, se ha propuesto el genipín como agente entrecruzador.

El genipín es un compuesto derivado de un glucósido llamado geniposide que se obtiene del fruto de la *Gardenia jasminoides* (Figura 15). Se trata de un compuesto biocompatible y presenta una menor toxicidad que otros entrecruzadores como el glutaraldehído (Arteche Pujana y cols., 2013).



**Figura 15:** Estructura molecular del genipín (imagen obtenida de Sigma-Aldrich).

En relación a algunas de las aplicaciones biomédicas de la CH y el CS, estos materiales se han utilizado como *i)*, sustituto de piel para la cicatrización de heridas, dado su carácter hemostático y su capacidad de estimular la regeneración y epitelización (Tang y cols., 2016); *ii)*, en IT del hueso (Deepthi y Jayakumar, 2016); y *iii)*, en la reparación condral (Zhou y cols., 2018). Además, estos biomateriales se han utilizado aislados (Zhao y cols., 2015) o combinados con ácido hialurónico (Yeh y cols., 2016), colágeno tipo II (Tamaddon y cols., 2017) y TGF- $\beta$  (Choi y cols., 2015), entre otros, para la IT del cartílago.

En el presente estudio hemos combinado aquellos elementos clave para generar un constructo cartilaginoso basado en la IT. Entre estos factores se incluyen el cultivo de

hASCs en esferoides 3D, un biomaterial poroso de origen natural (GCS/CHNC0.5), las condiciones de hipoxia (5% O<sub>2</sub>) y todas las señales reguladoras necesarias para la inducción de la diferenciación condrogénica *in vitro*.





### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Considerando las escasas propuestas terapéuticas que existen actualmente para el tratamiento de la OA y teniendo en cuenta el creciente desarrollo de la ingeniería tisular como opción terapéutica prometedora, el **Objetivo General** de este estudio es diseñar un constructo de IT para su posible aplicación en lesiones condrales.

Este objetivo general se fundamenta en la siguiente **Hipótesis**:

La combinación de un biomaterial constituido por una base de quitosano y nanocristales de quitina con esferoides de hASCs cultivados en un medio inductor de la diferenciación condrogénica y en condiciones de hipoxia, permite obtener un constructo de IT que pudiera ser de utilidad en la reparación de lesiones condrales.

Para demostrar esta hipótesis, se plantean los siguientes **Objetivos Específicos**:

1. Establecer el modelo de diferenciación condrogénica de las hASCs en sistemas de cultivo bi y tridimensionales.
2. Evaluar el estado de diferenciación, en términos de síntesis de matriz extracelular condral, de los esferoides de hASCs diferenciados hacia estirpe condrogénica en condiciones de normoxia e hipoxia.
3. Estudiar la cinética de degradación enzimática mediada por lisozima de los biomateriales constituidos por quitosano y diferentes proporciones de nanocristales o nanofibras de quitina.
4. Analizar la biocompatibilidad *in vitro* de los biomateriales constituidos por quitosano y diferentes proporciones de nanocristales o nanofibras de quitina.
5. Establecer los parámetros que permitan obtener un constructo de ingeniería tisular para su utilización como sustituto de cartílago, analizando el nivel de

### III. Hipótesis y objetivos

---

diferenciación condrogénica (producción de sGAG) de los esferoides de hASCs diferenciados en el biomaterial CS/CHNC en condiciones de hipoxia.

## **IV. METHODOLOGY AND RESULTS OF THE EXPERIMENTAL WORK**



## **IV.1 Chapter I: Establishment of the hASCs culture model**









## **IV.1 Chapter I: Establishment of the hASCs culture model**

### **IV.1.1 Materials and methods**

#### **IV.1.1.1 Chondrogenic differentiation of hASCs in standard 2D culture model**

hASCs, kindly supplied by Histocell SL (Zamudio's Scientific Park, Biscay, Spain), were maintained in control media (CM) consisting of DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-Glutamax (Gibco, Paisley, UK), supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Lonza, Verviers, Belgium) and 10% fetal bovine serum (FBS; Biochrom AG, Berlin, Germany).

In order to induce chondrogenic differentiation, hASCs in CM were seeded in 6-well culture plates (Corning, NY, U.S) at a density of  $15 \times 10^4 / \text{cm}^2$  and allowed to adhere for 24 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. To induce hASCs chondrogenic differentiation, the CM was removed and cells were washed with 1X sterile phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich, St. Louise, U.S). Then, 3 mL of the STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit (chondrogenic induction media, CIM; Gibco, Paisley, UK) supplemented with 10 mg/mL of gentamicin (Sigma-Aldrich, St Louis, U.S) were added. The media were changed twice a week. Samples were imaged on days 7, 14 and 21 days under a phase-contrast microscope (Nikon Eclipse TS100, Tokyo, Japan) using IC Capture 2.3 program (The Imaging Source, Germany, Europe).

#### **IV.1.1.2 Chondrogenic differentiation of hASCs in cell *pellet* culture (PC) model**

hASCs differentiation was also performed in 3D cell *pellets*. For this,  $2.5 \times 10^5$  hASCs in 300  $\mu\text{L}$  of either CM or CIM were seeded into 15 mL polypropylene tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). The samples were centrifuged for 5 minutes at 400 g and maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. hASCs were spontaneously condensed into pellets and transferred to a 24-well ultralow attachment culture plate (Corning NY,

U.S). Pellets from each condition were topped-up with either CM or CIM to 1 mL and cultured for 7, 14 and 21 days. The media were changed twice a week.

For histological analysis, all *pellets* were harvested at 7, 14 and 21 days, washed in PBS and fixed in paraformaldehyde 4% (PanReac Applichem, Barcelona, Spain) for 20 min at room temperature. Then, samples washed in 1X PBS, embedded in 1% agarose (Conda, Madrid, Spain) in PBS to facilitate the handling and fixed again in paraformaldehyde 4% for 1 h at 4°C. Finally, all pellets were dehydrated with serial concentrations of ethanol (50-100%), immersed twice in methyl benzoate (VWR Chemicals, Leuven, Belgium), citrosol (PanReac AppliChem, Barcelona, Spain) and embedded in paraffin wax (Fibrowax™ VWR Chemicals, Leuven, Belgium). Histological sections of 5 µm thickness were immersed in citrosol and rehydrated in a series of ethanol followed by washing in tap water for 5 min.

For collagen detection, histological sections were stained with Masson's trichrome (stained in blue to green) and for the detection of sulphate glycosaminoglycan (sGAG), samples were stained with safranin-O (0.1% w/v) and alcian blue (1% w/v; both from Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S), where sGAG were stained orange to red and blue, respectively. As a histological reference, hematoxylin and eosin staining (H/E; both from Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) was also performed. After the staining, all sections were dehydrated, immersed three times in citrosol for 5 min and mounted with a cover slip containing DPX mountant (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S). The samples were examined by bright field light microscope (Olympus BX50) and images were taken using Cell<sup>A</sup> program (Olympus Soft Imaging Solutions).

##### **IV.1.1.3 Chondrogenic differentiation of hASCs in the 3D *hanging-drop* culture model**

In order to obtain hASCs spheroids, the *hanging-drop* technique was used (Ruedel *et al.*, 2013). This method allows spontaneous cell aggregation by culturing cell suspensions on the inner side of tissue culture dishes. Briefly, drops of 30 µL of CM

containing  $1 \times 10^4$  cells were seeded on the cover of a plastic petri dish (J.D Catalán, Spain) and allowed to aggregate over for 48 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. After this time, spheroids (two/well) were transferred into a 24-well ultralow attachment culture plate and 200 µL of the CM were added to each well in the case of control group. For chondrospheroids (chondrogenic differentiation group), samples were washed in PBS and 200 µL of the CIM supplemented with gentamicin (10 mg/mL) were added. Spheroids from both culture conditions were maintained for 7, 14 and 21 days under normoxia conditions (20% O<sub>2</sub>). The media was replaced twice a week. For histological analysis, samples were processed as previously described.

#### *IV.1.1.3.1 hASCs spheroids volume quantification*

hASCs spheroids (control group and chondrospheroids), formed by hanging-drop technique and cultured in normoxia conditions, were imaged on days 7, 14 and 21 days using IC Capture 2.3 program under a phase-contrast microscope (Nikon Eclipse TS100, Tokyo, Japan). Spheroids radius ( $r$ ) were measured using a computer-based image analysis system (Image J, NIH, U.S) and the volume was calculated assuming perfect spheres ( $n_{\text{spheroids}} = 50$ ).

### **IV.1.2 Results**

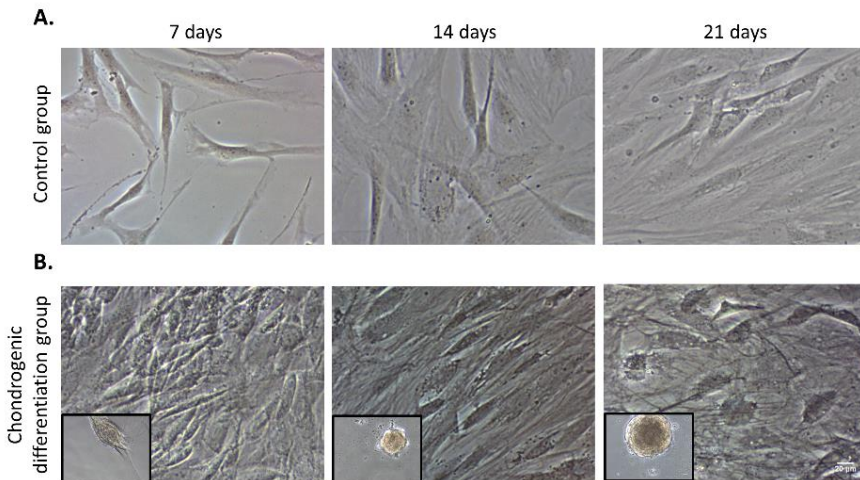
In order to establish the appropriate hASCs culture model for *in vitro* chondrogenic differentiation, 2D or 3D cultures, were performed in normoxia conditions (20% O<sub>2</sub>).

#### **IV.1.2.1 Chondrogenic differentiation of hASCs in the 2D culture model**

Cell culture analysis using inverted phase-contrast microscopy showed that 2D hASCs cultured at 7 days in CM group did not form any cell aggregates during the

culture period, as cells showed flattened and characteristic spindle-like fibroblastic morphology with long and thin cytoplasmic processes (Figure 16A).

In contrast, hASCs cultured in CIM tended to move closer one to another and began to form small cell aggregates. This cellular condensation started shortly after the chondrogenic induction. The cell aggregates became larger after 14 and 21 days of culture (Figure 16B), when most of the cells were involved in the aggregates formation. On day 21 of chondrogenic induction, the dense cell micromass became darker in colour due to increased ECM production. In some areas of the culture plate, the remaining isolated cells showed several morphological changes from day 7, adopting the typical round and polygonal morphology of chondrocytes (Figure 16B).

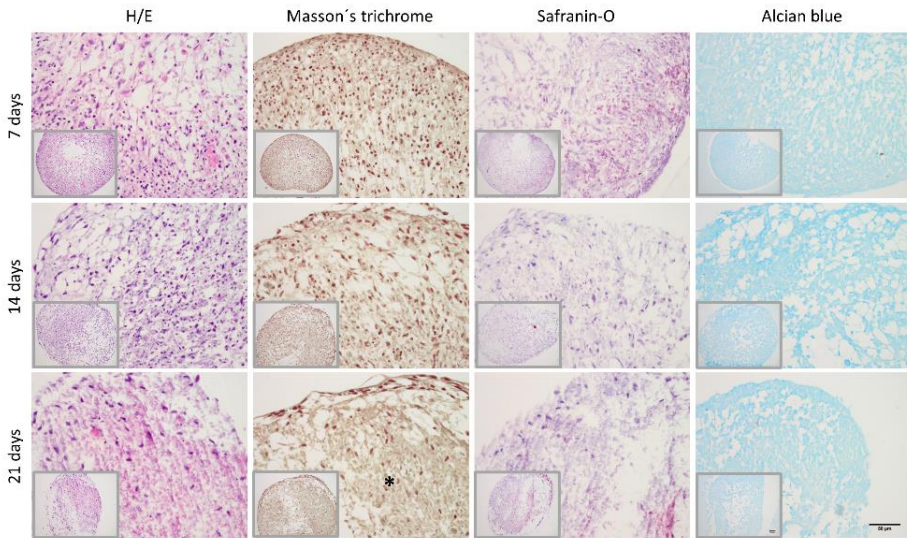


**Figure 16:** Contrast-phase micrographs of hASCs cultured under (A) CM or (B) CIM for 7, 14 and 21 days in normoxia conditions. The scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ .

##### IV.1.2.2 Chondrogenic differentiation of hASCs in the 3D PC culture model

In order to mimic the physiological microenvironment of the hASCs and together with the spontaneous tendency of hASCs to form cell aggregates, the chondrogenic differentiation of hASCs was performed by the 3D PC model.

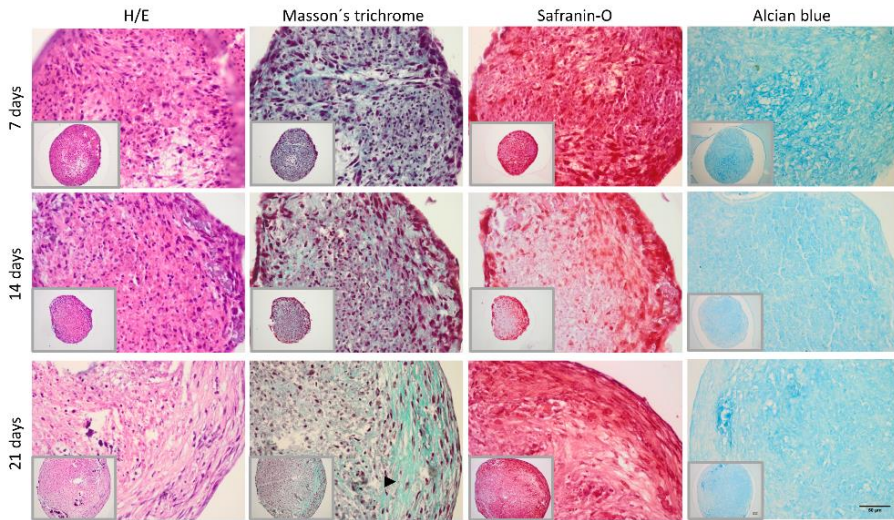
hASCs grown in pellets led to the formation of spheroids, both in presence of CM and CIM. Figure 17 shows histological images of hASCs pellets cultured in CM. At 7 days of culture, cells forming spheroids showed a homogeneous distribution, as can be seen by H/E and Masson's trichrome staining. However, at longer culture times, spheroids tended to lose cell-cell contacts and their characteristic cohesion, increasing the intercellular space between cells.



**Figure 17:** Histological staining of hASCs PC spheroids cultured in control media at 7, 14 and 21 days. The (\*) shows the intercellular space. The scale bar represents 50  $\mu$ m.

The histological evaluation of the chondrogenic differentiation level of the chondrospheroids cultured in CIM, in terms of ECM synthesis, showed positivity for Masson's trichrome, safranin-O and alcian blue staining. Moreover, there was a progressive increase of collagen and sGAG deposition from 7 to 14 and 21 days of culture as shown by Masson's trichrome and Safranin-O, respectively. At longer culture times, the ECM deposition was located at the periphery of the spheroids, where cells

were surrounded by collagen fibers, as occurred with mature chondrocytes in cartilage (Figure 18).



**Figure 18:** Histological staining of hASCs PC spheroids cultured in chondrogenic induction media at 7, 14 and 21 days. The arrow head marks chondrocyte-type cells surrounded by ECM. The scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ .

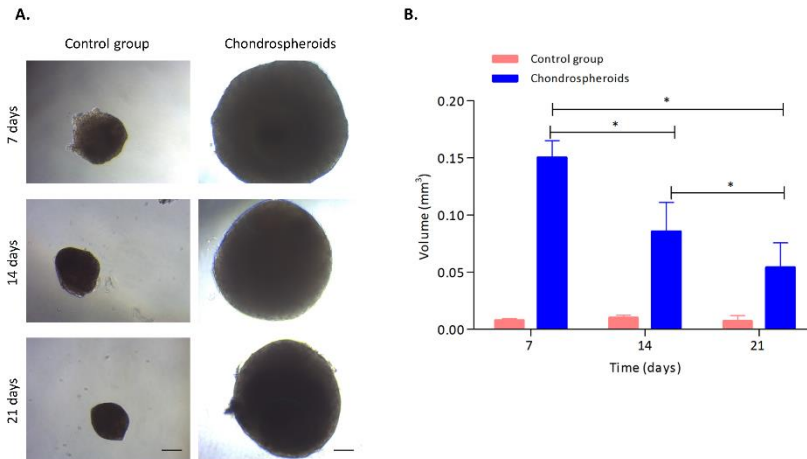
#### **IV.1.2.3 Chondrogenic differentiation of hASCs in the 3D *hanging-drop* culture model**

We observed that hASCs spheroids formed by *hanging-drop* technique displayed compact rounded cell aggregation that maintained their physical structure during all the experimentation time (Figure 19A). In order to assess the suitability of this hASCs 3D culture model, volume quantification and histological analysis were done.

The quantification of the volume gives an approach of cell proliferation, matrix deposition and volume of the intercellular space (Martínez *et al.*, 2008). Concerning their size, chondrospheroids showed higher volume values (ranging from  $0.05 \pm 0.02 \text{ mm}^3$  to  $0.1 \pm 0.01$ ) compared to the control group (ranging from  $0.007 \pm 0.005 \text{ mm}^3$  to



0.008 ± 0.002) (Figure 19A,B). However, in both, control group and chondrospheroids, there was a shrinking trend in the volume from 7 to 21 days, leading to a size reduction between 8.75 ± 0.025% and 64 ± 0.03%, respectively.



**Figure 19:** hASCs spheroids from the control group (CM) and chondrospheroids (CIM) at 7, 14 and 21 days (A) bright-field images and (B) spheroid volume quantification. The scale bar represents 100  $\mu$ m

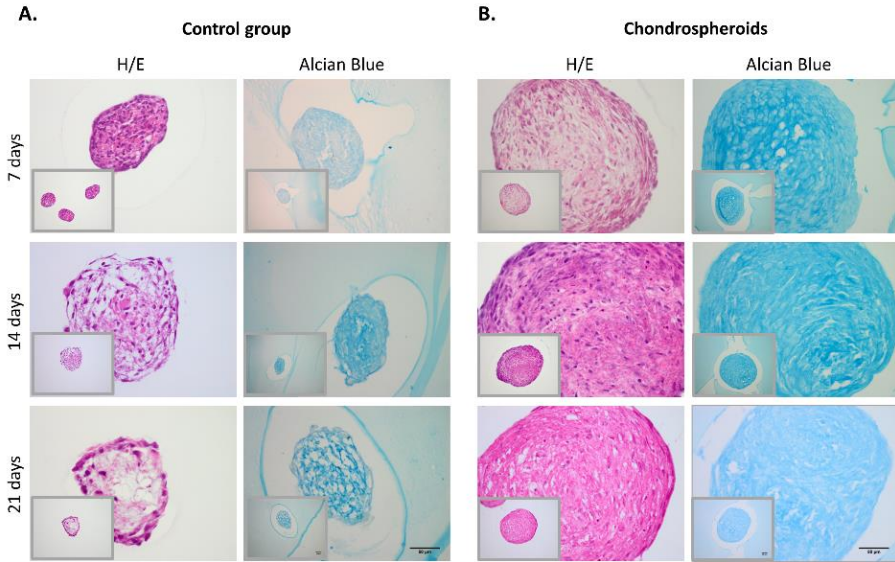
In order to evaluate the chondrogenic differentiation level and hASCs morphology H/E and alcian blue stainings were done.

Figure 20 shows the histological structure of the control group and chondrospheroids at 7, 14 and 21 days of culture. The hASCs of spheroids from the control group formed a compact structure at 7 days of culture. However, at longer culture times there was an increasingly higher intercellular space (Figure 20A) due, at least in part, to the cell death occurring inside the spheroid (apoptotic nuclei).

#### IV. Methodology and results of the experimental work

---

In the case of chondrospheroids, the evaluation of the chondrogenic differentiation level showed positivity to alcian blue staining (Figure 20B) due to sGAGs production and deposition in the intercellular space. Moreover, at 14 days of culture there was a peak in the chondrogenic differentiation as demonstrated by a higher alcian blue staining.



**Figure 20:** Histological staining of hASCs *hanging-drop* spheroids cultured in (A) CM (control group) and (B) CIM (chondrospheroids) at 7, 14 and 21 days. The scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ .

**IV.2 Chapter II. *In vitro* degradation studies of GCS  
and GCS-based bionanocomposites**



## IV.2 Chapter II: *In vitro* degradation studies of GCS and GCS-based bionanocomposites

### IV.2.1 Materials and methods

To determine the *in vitro* degradation of the Genipin-cross-linked CS (GCS) and GCS/CH nanoform biomaterials, both 2D films (0.5 cm<sup>2</sup>) and 3D porous scaffolds (0.3 cm<sup>3</sup>) were weighed ( $W_0$ , as dry weight) and sterilized in ethanol 70% for 2 hours. Then, samples were washed in sterile PBS (Sigma-Aldich, St. Louise, U.S) and placed in a 24 well culture plate (Corning, NY, U.S) with PBS at 37°C for stabilization and pre-wetted. After 24 h, the biomaterials were weighted ( $W_1$ , as the initial wet weight) and maintained either in PBS with or without lysozyme (2 mg/mL; Sigma-Aldich, St. Louis, U.S) for 84 days at 37°C in an oven. Every 7 or 14 days, the GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds were taken out from the PBS or lysozyme solution, gently removed the excess of water and weighed ( $W_t$ , as the weight at time  $t$ ). The solutions were replaced twice a week and the wet weight remaining ratio was calculated as follows:

$$\text{Wet weight remaining ratio (\%)} = W_t/W_1 \times 100 \quad (1)$$

In another set of experiments, the *in vitro* degradation of the GCS and GCS/nanoCH biomaterials was assessed but in presence of adhered hASCs. As described previously, GCS and GCS/nanoCH biomaterials were sterilized, weighed ( $W_0$ , as dry weight) and placed in a 24-well ultralow attachment culture plate (Corning, NY, U.S). Then, the biomaterials were pre-wetted in complete culture medium containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium + GlutaMAX™ (DMEM, Gibco, Paisley, UK) and supplemented with 10% of FBS (Biochrom AG, Berlin, Germany), 1% penicillin-streptomycin (Lonza, Verviers, Belgium) for 24 h at 37°C in an oven. Pre-wetted biomaterials were then weighed ( $W_1$ , as wet weight) and drops of 15 µL containing  $5 \times 10^4$  cells in culture media were seeded onto the 2D films and 3D porous scaffolds and allowed to adhere at 37°C. After 24h, samples were weighted ( $W_2$ , as the wet weight after cell adhesion) and cultured in CM containing 2 mg/mL of lysozyme for 84 days at 37°C. Every

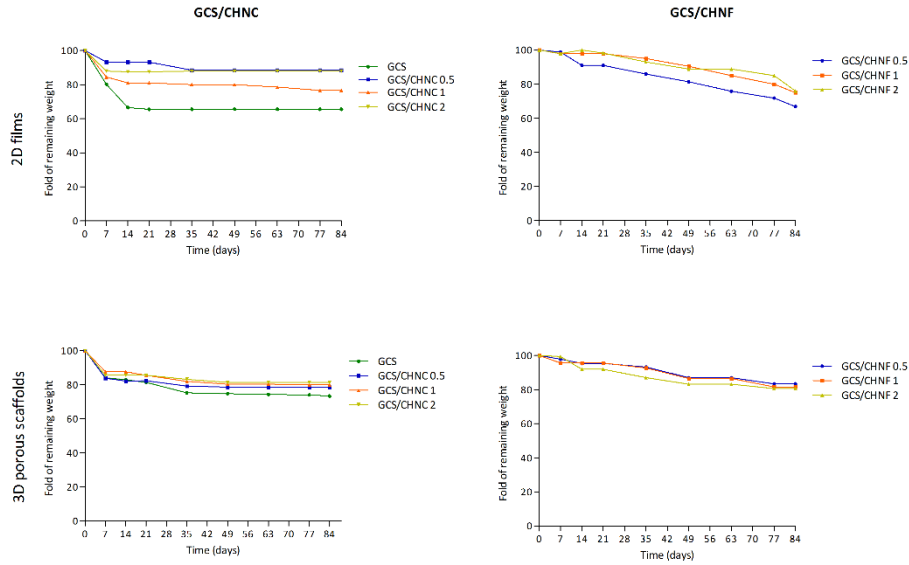
7 or 14 days, the biomaterials were gently dried to remove the excess of solution, washed in distilled water and weighted ( $W_t$ , as the weight at time  $t$ ). Like for the first tests, the lysozyme solution was replaced twice a week and the percentage of remaining weight was calculated using equation 1.

### IV.2.2 Results

CS is degradable *in vitro* at a slow rate, however in the presence of lysozyme the degradation speed can be accelerated (Onishi y Machida, 1999). Lysozyme concentration values in human cartilage comprise between 0.80-3.03  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Thus, in order to mimic the physiological conditions, lysozyme was used at a concentration of 2  $\text{mg ml}^{-1}$  (Choi y *cols.*, 2014).

As expected, both GCS and GCS/nanoCH biomaterials were stable in the absence of lysozyme during the incubation time. The GCS material presented a relatively quick degradation at 14 and 7 days in the case of the 2D and 3D porous scaffolds, respectively. From these time points on, there was a stabilization in the weight of the biomaterials until the end of the study with values comprising the 65% and 74% of the remaining wet weight for the 2D films and 3D porous scaffolds, respectively. The incorporation of the nanoCH to the GCS-based material produced a slowdown in the degradation rate compared to the GCS material. Moreover, there was a very similar behavior among different nanoCH concentrations for both 2D films and 3D porous scaffolds (Figure 21). The Table 2 summarizes the remaining wet weight (%) of the 2D films and 3D porous scaffolds at the end of the study, with values ranging from 74% to 83%.

#### IV. Methodology and results of the experimental work



**Figure 21:** *In vitro* mass loss (%) of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds in PBS.

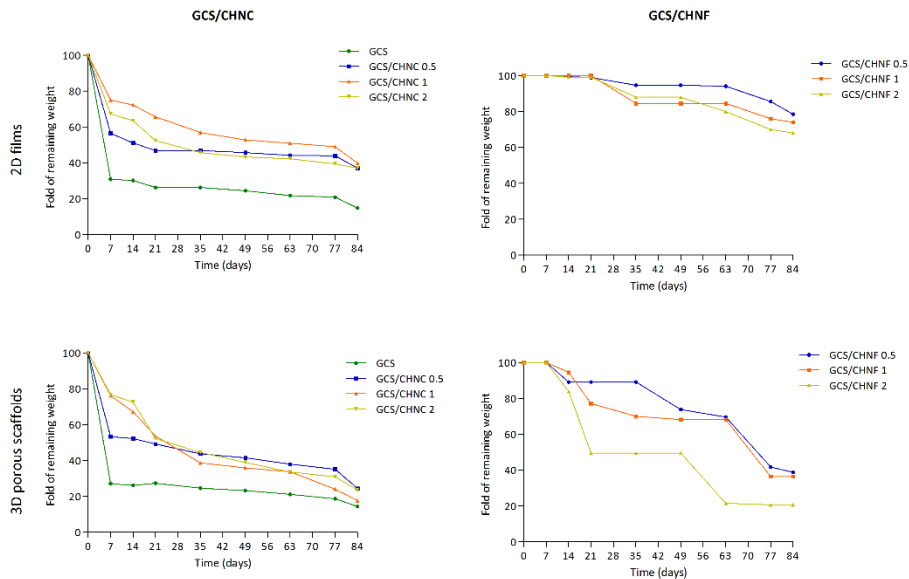
**Table 2:** Percentage (%) of the remaining wet weight of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds cultured in PBS at 84 days. The data is presented as Mean $\pm$ SD.

Biomaterials	2D films	3D porous scaffolds
GCS	65.50 $\pm$ 0.04	73.45 $\pm$ 0.24
GCS/CHNC0.5	85.51 $\pm$ 0.19	78.65 $\pm$ 0.13
GCS/CHNC1	76.60 $\pm$ 0.11	80.00 $\pm$ 0.12
GCS/CHNC2	87.94 $\pm$ 0.01	81.47 $\pm$ 0.16
GCS/CHNF0.5	66.85 $\pm$ 0.90	83.40 $\pm$ 0.15
GCS/CHNF1	75.00 $\pm$ 0.11	81.60 $\pm$ 0.20
GCS/CHNF2	76.00 $\pm$ 0.01	80.70 $\pm$ 0.12

In the presence of lysozyme, a significant time-dependent loss of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds was observed (Figure 22). The GCS base material showed a remaining wet weight of 15% and 14% at the end of the study (84

days) for the 2D films and 3D porous scaffold, respectively. In the case of the GCS/nanoCH biomaterials, 2D films degrade a slower rate than the 3D porous scaffolds, being this behavior more evident in the GCS/CHNF materials. Regarding these last samples, the 2D films presented a very slow and progressive degradation. Thus at the end of the study, the remaining wet weight was 78% for GCS/CHNF0.5, 74% for GCS/CHNF1 and 68% for GCS/CHNF2 2D films. In contrast, the degradation of the 3D porous scaffolds was higher compared (table 3). From the 7<sup>th</sup> day of culture, the GCS/CHNF2 scaffold had the highest degradation, with a remaining weight of 20% at 84 days of culture.

Moving GCS/CHNC biomaterials, those with less nanoCH ratio presented a faster degradation up to 21 days of culture, for both 2D films and 3D porous scaffolds. From this time on, all the biomaterials present a slowdown in the degradation rate (Figure 22). The Table 3 shows the remaining wet weight of the GCS and GCS/nanoCH biomaterials in the presence of lysozyme at 84 days of culture.



**Figure 22:** *In vitro* mass loss (%) of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds in PBS + 2mg/mL of lysozyme up to 84 days of culture.



**Table 3:** Percentage (%) of the remaining wet weight of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds in PBS + 2mg/mL lysozyme. The data is presented as Mean $\pm$ SD.

<b>Biomaterials</b>	<b>2D films</b>	<b>3D porous scaffolds</b>
<b>GCS</b>	14.80 $\pm$ 0,01	14.42 $\pm$ 0.09
<b>GCS/CHNC0.5</b>	37.05 $\pm$ 0.03	24.45 $\pm$ 0.07
<b>GCS/CHNC1</b>	39.81 $\pm$ 0.04	17.68 $\pm$ 0.12
<b>GCS/CHNC2</b>	37.20 $\pm$ 0.10	26.60 $\pm$ 0.04
<b>GCS/CHNF0.5</b>	78.54 $\pm$ 0.02	38.75 $\pm$ 0.01
<b>GCS/CHNF1</b>	74.32 $\pm$ 0.20	36.35 $\pm$ 0.23
<b>GCS/CHNF2</b>	68.13 $\pm$ 0.04	20.70 $\pm$ 0.05

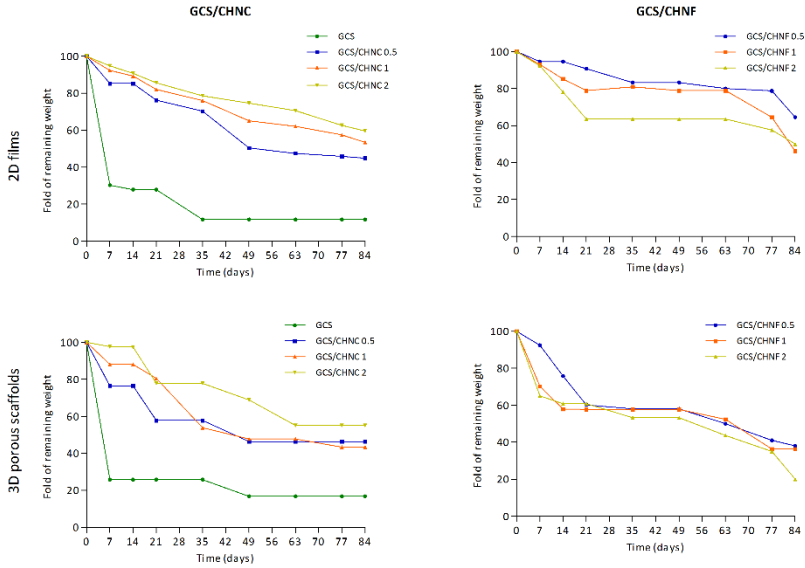
In another set of experiments and with the aim of reproducing in a more optimal way the physiological conditions, the *in vitro* mass loss of the GCS and GCS/nanoCH biomaterials with adhered hASCs was studied (Figure 23).

As occurred previously, the 2D films degraded more slowly compared to the 3D porous scaffolds. In addition, the incorporation of nanoCH to the GCS base material also produced a slowdown in the degradation rate. Regarding GCS/CHNC and GCS/CHNF degradation behavior, the GCS/CHNC with lower CH concentration (0.5) degraded faster compared to the other concentrations for both 2D films and 3D porous scaffolds. However, at the end of the study the *in vitro* mass loss was similar for GCS/CHNC0.5 and GCS/CHNC1 3D porous scaffolds.

Moving to CHNF, it can be seen that 2D films with higher CH concentration degrade faster. In the case of the 3D porous scaffolds, there was an earlier mass loss in the GCS/CHNF1 and GCS/CHNF2 at 21 days of culture. However, from this time on there was a homogeneous mass loss pattern at 77 days of culture. However, the GCS/CHNF 3D porous scaffolds had a significant drop in its weight at the end of the study (Figure

#### IV. Methodology and results of the experimental work

23). Table 4 shows the remaining wet weight of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds at 35 days of culture. At this time point, the results showed that most of the biomaterials have lost half of its weight, comprising values between 53.33 and 77.83%.



**Figure 23:** *In vitro* mass loss (%) of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds with adhered hASCs up to 84 days of culture.

**Table 4:** Percentage (%) of the remaining wet weight of the GCS and GCS/nanoCH 2D films and 3D porous scaffolds with adhered hASCs cultured in DMEM glutamax™ and 2 mg/ml of lysozyme at 35 days. The data is presented as Mean±SD.

<b>Biomaterials</b>	<b>2D films</b>	<b>3D porous scaffolds</b>
<b>GCS</b>	11.74 ± 0.04	25.81 ± 0.23
<b>GCS/CHNC0.5</b>	70.30 ± 0.05	57.75 ± 0.06
<b>GCS/CHNC1</b>	76.03 ± 0.05	53.86 ± 0.07
<b>GCS/CHNC2</b>	78.63 ± 0.07	77.83 ± 0.33
<b>GCS/CHNF0.5</b>	83.33 ± 0.25	58.00 ± 0.05
<b>GCS/CHNF1</b>	80.95 ± 0.76	57.81 ± 0.64
<b>GCS/CHNF2</b>	63.56 ± 0.067	53.33 ± 0.43





### **IV.3 Chapter III. Study of chitin nanoforms mechanical and topological cues to support growth of human adipose stem cells in chitosan matrices**

*Part of the methodology and results from this chapter are in collaboration with the Biorefinery Processes Research Group of the Polytechnic School, University of the Basque Country (UPV/EHU).*

*The methodology and results corresponding to this collaboration are marked with an asterisk (\*).*

### **IV.3 Chapter III. Study of the chitin nanoforms mechanical and topological cues to support growth of human adipose stem cells in chitosan matrices**

#### **IV.3.1 Materials and methods**

Chitosan (CS) with a DDA = 98% (determined by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy in  $\text{D}_2\text{O}$  containing a 1% of  $\text{CD}_3\text{COOD}$ ) and  $500\,000\text{ g mol}^{-1}$  (determined by viscosimetry) extracted from squids and processed to medical-grade was purchased from Mahtani chitosan pvt. Ltd. (India).

CHNC and CHNF were prepared in-house with chitin powder extracted from lobster exoskeletal waste (kindly supplied by Antarctic Seafood S.A. (Chile) following a valorization process adapted from previously published protocols using modified chemical and mechanical approaches, respectively (Salaberria *et al.*, 2015; Salaberria *et al.*, 2015; Salaberria *et al.*, 2015; Salaberria *et al.*, 2014; Goodrich and Winter, 2007; Gopalan Nair and Dufresne, 2003).

Sodium hydroxide (NaOH, reagent grade, 98%, pellets (anhydrous)), hydrochloric acid (HCl, ACS reagent, 37%), glacial acetic acid (ReagentPlus, 99%), Genipin (G,  $\geq 98\%$ ) acetone (analytical standard, 99%), and ethanol (analytical standard) were purchased from Sigma–Aldrich, Europe. All reagents were used as received without further purification, unless mentioned otherwise.

##### **IV.3.1.1 Preparation of 2D and 3D bionanocomposite materials (\*)**

**2D materials:** Genipin-cross-linked chitosan (GCS) bionanocomposite films were prepared by casting/evaporation process. Briefly, 1.0% (w/v) solution was first prepared by dissolving CS in aqueous  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (1.0% v/v) at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  under vigorous stirring for 48h. To this solution 0.5% w/w of Genipin, proportionate to the dry weight of CS, was added and stirred for 15 min at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Three different amounts of never-

dried CHNC or CHNF (weight ratio CS:Chitin nanoforms 1:0.5; 1:1; 1:2) were added and dispersed using an Heidolph Silent Crusher M (Germany) equipment at 20,000 rpm for 30 min. The entrapped air in the GCS/CHNC and GCS/CHNF suspensions was removed by vacuum degassing prior to casting in acrylic molds (10 cm (length) × 10 cm (width) × 0.5 cm (height)). Finally, the samples were incubated at 40°C for 24h in a ventilated oven to step-up the cross-linking reaction and to form composite films. GCS films (control samples) were obtained using the same procedure but without chitin nanoforms incorporation. Prior to characterization, all materials were kept in a conditioning cabinet at 50% relative humidity (RH) and 25°C for one week to ensure the stabilization of water content. The identification of Genipin-cross-linked CS materials was GCS/CHNC or GCS/CHNF, numbered with 0.5, 1 and 2, indicating the CHNC or CHNF ratio in the materials, respectively. The identification of all samples is summarized in Table 5.

**Table 5:** Identification of the GCS, GCS/CHNC and GCS/CHNF materials, (both 2D & 3D materials).

<b>Samples</b>	<b>Weight Ratio CS:nanochitin</b>	<b>Genipin (%)*</b>
GCS	0	0.5
GCS/CHNC0.5	1:0.5	0.5
GCS/CHNC1	1:1	0.5
GCS/CHNC2	1:2	0.5
GCS/CHNF0.5	1:0.5	0.5
GCS/CHNF1	1:1	0.5
GCS/CHNF2	1:2	0.5

*\* Related to the dry weight of chitosan*

**3D materials:** GCS porous scaffolds were prepared by freeze-drying and processing. Briefly, these materials were prepared by transferring different suspensions indicated in Table 5 into cylindrical glass containers of 5.0 cm length and 3.0 cm diameter. Like in the case of the 2D materials, to step up the cross-linking reaction, all



suspensions were stored at 40°C for 24h, but subsequently frozen at -20°C for 72h. The procedure to prepare GCS/CHNC and GCS/CHNF suspensions was the same as used to obtain composite films described above for 2D materials. Thereafter, the samples were frozen at -80°C for 72h and lyophilized using a CHRIST, ALPHA 1-4 LDplus (Germany) equipment with a condenser temperature of -55°C for 4 days. The ensuing porous scaffolds were trimmed to become 3D porous scaffolds with the apparent size of 4.5 cm height and 3.0 cm diameter and kept in a conditioning cabinet at 50% RH and 25°C to ensure the stabilization of their water content. GCS 3D porous scaffolds were prepared as control samples following the same procedures but with no addition of CHNC or CHNF. Parameters used for the identification of 3D porous scaffolds were the same as for films and are summarized in Table 5 above.

##### **IV.3.1.2 Physical & chemical characterization of the 2D and 3D materials (\*)**

The chemical composition of the starting and final composite materials was assessed by Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) on a Nicolet Nexus 670 FT-IR (Madison, U.S) apparatus equipped with a KRS-5 crystal of refractive index 2.4 and using an incidence angle of 45°. The spectra were taken in transmittance mode in the wave number range 750 - 4 000  $\text{cm}^{-1}$ , with resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  after 128 scan accumulations.

Transmittance spectra were measured using a Shimadzu UV-3600 UV-VIS-NIR spectrophotometer (Kyoto, Japan). Spectra were recorded at RT in steps of 1 nm in the 400–700 nm range.

X-ray diffraction (XRD) measurements were carried out using a Philips X'pert Pro automatic diffractometer (Eindhoven, The Netherlands) operating at 40 kV and 40 mA, in theta-theta configuration, secondary monochromator with Cu-K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ) and a PIXcel solid-state detector.

The morphology of chitin nanoforms and 2D materials was assessed using Atomic Force Microscopy (AFM). The images were acquired in a Dimension 3100 NanoScope IV (Veeco, USA). The images were scanned under ambient conditions using silicon nitride cantilevers having a nominal tip radius of 10 nm. Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to assess the morphology of the 3D porous scaffolds using a Hitachi SU-70 microscope (Tokyo, Japan) to evaluate the morphology of the composite films. All samples were coated with Chromium (to avoid charging of the samples in the SEM). The images were collected with a voltage of 20 keV. The 3D porous scaffolds were cut into pieces along the transverse axis and mounted on glass plates. To determine the dimensions of the pores, 40 pores of the cross-section were measured and quantified from the SEM images.

Mechanical properties of the composite films were determined by tension using a miniature material tester MiniMat 2000 (Rheometric Scientific, U.S), using a load cell of 200 N and the cross-head speed was 1 mm min<sup>-1</sup>. Ten replicates of each sample (rectangular-shape specimens 1.0 ×10.0 cm) were used to measure the average value of Young's modulus, tensile strength and elongation at break. The Young's modulus of the 2D films was determined from the typical stress-strain curves of the materials. On the other hand, the mechanical properties of the 3D scaffolds were evaluated by compression testing. These tests were done in accordance with ISO 844:2007 for foams on cylindrical specimens (diameter: 1.5 cm, height: 3.0 cm) with a MTS Insight 10 (U.S) equipment using Instron compression plates with a diameter of 5.0 cm. A 500 N load cell was used with a compression rate of 10% of the original sample thickness per minute. The final strain was set at 80% of the original specimen height (not 15% as suggested in the ISO-standard) in order to evaluate the material behavior over larger deformation intervals. After the compression tests, samples were stored at 50% RH and 25°C and the residual height of the specimens was measured after 72 h and the strain recovery calculated. Samples were tested in quadruplets. The Young's modulus of the 3D porous scaffolds was calculated as the maximum 'linear' slope of the compressive stress–strain curves in the linear-elastic region.

The swelling ratio of each 2D composite films (1.0 × 1.0 cm) was determined by immersing the samples (with known weight) in 10 mL of phosphate buffered (1X PBS, pH 7.4) and incubated at 37 °C under static conditions for 24h. The swelling ratio was determined from equation (2), where  $W_s$  is the swollen sample weight and  $W_d$  is the dry sample weight.  $W_s$  was determined by first removing the excess surface PBS from the swollen sample with filter paper and weighing the sample immediately on an analytical balance. The swelling ration for all samples were calculated using equation (2) below:

$$\text{Swelling (\%)} = (W_s - W_d)/W_d \times 100 \quad (2)$$

Where:  $W_d$  = Weight of dry polymer;  $W_s$  = Weight of swollen polymer

Each experiment was repeated three times, and the average value recorded.

The porosity of 3D scaffolds, was measured by the principle of liquid displacement (Gopalan Nair and Dufresne, 2003). Ethanol (absolute, Sigma-Aldrich, Europe) was used as displacement liquid as it permeates through scaffolds without swelling or shrinking of the matrix. In brief, the 3D scaffolds (dry weight,  $W_d$ ) were immersed in a known volume ( $V_1$ ) of ethanol in a graduated cylinder for 5 minutes. The total volume of ethanol and the ethanol-impregnated scaffold was recorded as  $V_2$ . The ethanol-impregnated scaffold was then removed from the cylinder and the residual ethanol volume was recorded as  $V_3$ . The total volume of the scaffold was calculated using equation (3) below:

$$V = (V_2 - V_1) + (V_1 - V_3) = V_2 - V_3 \quad (3)$$

$V_2 - V_1$  is the volume of the scaffold and  $V_1 - V_3$  is the volume of the ethanol within the scaffold. The percentage porosity of the scaffolds (P) was obtained using equation (4)

$$P (\%) = (V_1 - V_3) + (V_2 - V_3) \times 100 \quad (4)$$

Water uptake was evaluated by immersing the 3D materials (three replicates for each sample) in deionized water at 25°C for 24h (Kim *et al.*, 2005). Excess water was removed and wet weight of the samples ( $W_w$ ) measured. Afterwards, the samples were dried overnight in an oven at 65°C under vacuum, and subsequently dry weight of the samples ( $W_d$ ) was measured. Finally, the water uptake of the scaffolds was calculated using equation (5) below:

$$\text{Water uptake (\%)} = ((W_w - W_d) / W_w) \times 100 \quad (5)$$

##### **IV.3.1.3 *In vitro* biocompatibility of 2D and 3D composite materials**

To determine the *in vitro* biocompatibility of GCS and GCS composite materials, in both 2D films and 3D porous scaffolds, cytotoxicity and cell adhesion studies were carried, according to published ISO 10993-5 protocols and are briefly described below.

**Cells:** L-929 murine fibroblasts (ATCC; *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, U.S) from an immortalized cell line were cultured in CM containing Minimum Essential Medium (MEM), supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids (all from Gibco, Paisley, UK), 1% penicillin-streptomycin (Lonza, Verviers, Belgium) and 10% FBS (Biochrom AG, Berlin, Germany).

hASCs, kindly supplied by HistoCell SL. (Zamudio's Scientific Park, Biscay, Spain), were maintained in CM containing Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-Glutamax™, supplemented with 1% penicillin-streptomycin and 10% FBS according to the supplier's recommendations.

**Preparation of extraction media:** 2D films (6 cm<sup>2</sup>) and 3D porous scaffolds (1.25 cm<sup>2</sup>; thickness >1mm) of GCS, GCS/CHNC and GCS/CHNF materials were sterilized in 70% ethanol for 2h and washed three times in PBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S).

The media extract was obtained by incubating the previously sterilized GCS and GCS nanocomposite materials in 1 mL of CM for 24 h at 37°C. Positive and negative controls were obtained in the same conditions as above using polyvinyl chloride (PVC) and high-density polyethylene (HDPE), respectively (both from USP Rockville, MD).

**Cytotoxicity assay:** In order to determine the cell viability of both murine L-929 fibroblasts and hASCs cultured in the media extracts, a colorimetric assay of methyl tetrazolium tetrabromide (MTT; Sigma-Aldrich, U.S) was performed according to the ISO 10993-5 protocol. Briefly, L-929 murine fibroblasts and hASCs were seeded in 96 well-plates (Sarstedt, Newton, U.S) at a density of  $4 \times 10^3$  cells per well and allowed to adhere for 24h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Then, the CM was removed and 100 µl of the media extracts from the soaked materials were added to each well of the 96 culture plates (n=3). After an incubation of 24 h, the cell cultures were treated with 10 µl of MTT (5 mg/ml in PBS) and incubated for further 3 h at 37°C. Post incubation, the MTT was removed and 100 µl per well of DMSO (Sigma-Aldrich) were added to dissolve the formazan crystals. Aliquots were taken and the absorbance of the formazan solution was measured at 540 nm (Synergy HT spectrophotometer, Biotek, U.S). This absorbance is proportional to the number of viable cells, established through a standard curve on untreated cells. Viability (%) was calculated from equation (6) below:

$$\text{Viability (\%)} = ([A]_{\text{test}} / [A]_{\text{control}}) \times 100 \quad (6)$$

Where  $[A]_{\text{test}}$  is the absorbance of the sample cells and  $[A]_{\text{control}}$  is the absorbance of the negative control (cells cultured in HDPE extractive medium).

**Cell adhesion studies:** Cell adhesion, morphology and viability of adherent cells were evaluated by SEM analysis and *Live/Dead* assay. In all cases, 2D films (0.5 cm<sup>2</sup>) and 3D porous scaffolds (0.3 cm<sup>3</sup>) of GCS, GCS/CHNC and GCS/CHNF, the samples were placed in 24-well ultralow attachment culture plates (Corning NY, U.S). Sterilized biomaterials were pre-wetted in complete culture medium for 24 h, at 37°C in a

humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. After that, drops of 15 µl of complete culture media containing 5x10<sup>4</sup> or 6x10<sup>4</sup> cells were then seeded onto the 2D films and 3D porous scaffolds, respectively.

The *Live/Dead* assay was performed at 7 (2D films) or 14 days (3D porous scaffolds), by incubating the cells with 4 µM of calcein-AM (Sigma-Aldrich) and 5 µM ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Eugene, OR). Samples were observed under UPLANAPO 10X/0.4 lens (Olympus, Japan) and a confocal microscope (Olympus LV500, Japan) to visualize adherent viable cells (green fluorescence from Calcein;  $\lambda_{ex} - \lambda_{em} = 490 - 515$  nm) and dead cells (red fluorescence from ethidium homodimer;  $\lambda_{ex} - \lambda_{em} = 490 - 630$  nm).

SEM analysis of the L-929 fibroblasts and hASCs adhered and proliferating on the surface of 2D films were performed at 72 h post seeding. In the case of the 3D porous scaffolds, samples were analyzed at 7, 14 and 21 days. All samples were rinsed 3X in Sorensen buffer (Panreac AppliChem, Spain), fixed using 2% glutaraldehyde (Panreac) for 24 h, washed 3X in Sorensen buffer (Panreac), dehydrated using a series of gradient ethanol solutions and dried in hexamethyldisilazane for 10 min. The samples were then sputtered with a thin layer of gold under an argon atmosphere and observed using a Hitachi S-4800 scanning electron microscope with an accelerating voltage of 15 keV.

### **IV.3.2. Results and discussion**

#### **IV.3.2.1 Synthesis and characterization of the composite 2D films and 3D scaffolds (\*)**

Our main aim in this study was to compare and provide a better understanding of the role of different chitin nanoform building blocks on the functional, structural and biological properties of chitosan-based biomaterials for Tissue Engineering and

Regenerative Medicine (TERM) applications. Herein, we specifically focus on chitin nanoforms that exhibit structural features with different morphologies: (i) nanocrystals (CHNC) that present a rod-like morphology with average diameter of 30 nm and length of 200 nm. (Figure 24A); and (ii) nanofibers (CHNF) with long and highly entangled nano-size fibrils with average widths of 85 nm and lengths of 5  $\mu\text{m}$  (Figure 24A). Overall we designed and compared two different architectures, i.e. 2D films and 3D porous scaffolds in the form of composites for this study (Figure 25).

As a first step, we focused on developing a cross-linking mechanism for the two-component materials. In this case, some of the physical entanglements within the CS chains were replaced by chemical bonds as a result of Genipin cross-linking, i.e. permanent covalent networks. As illustrated in Figure 25, Genipin can in a single-step undergo covalently cross-linking with amine groups on the CS backbone and also with the residual  $\text{NH}_2$  groups on the surface of the CHNC or CHNF. This facilitates formation of bridges between CS and the nanoforms providing additional topology and mechanical properties (Figure 25A and B), and will be discussed further on. As expected, the percentage of  $\text{NH}_2$  groups on the chitin nanoforms was found to be much lower (CHNC DDA=8% and CHNF DDA=3%, determined by  $^{13}\text{C}$  NMR; Figure S1.A, Supplementary Information), than on chitosan chains (DDA=98%). Consequently, the available cross-linking sites were considerably lower in number on the chitin nanoforms for Genipin aided crosslinking.

Two main types cross-linking reaction mechanisms are postulated *i)* the fastest reaction is a nucleophilic attack by the chitosan  $\text{NH}_2$  groups on the olefinic C-3 of Genipin, which results in the opening of the dihydropyran ring; whereas *ii)* the slower reaction is a nucleophilic substitution involving the ester group of Genipin resulting in a secondary amide linkage (Muzzarelli, 2009). As side reactions, simultaneous intrinsic *in situ* polymerization between Genipin molecules already linked to  $\text{NH}_2$  groups of chitosan creating a dense network is also possible (Muzzarelli, 2009). Additionally, hydrogen bonds can be formed between the OH groups of the CH nanoforms and the

free primary amino groups on the CS backbone. These interfibrillar hydrogen bonds and entanglements provide additional structural reinforcement and integrity of the ensuing 2D films and 3D porous scaffolds. The final materials were stable in water and did not lose their shape in a conditioning cabinet at 50% humidity and 25°C for more than a year.

After the cross-linking reaction, GCS, GCS/CHNC and GCS/CHNF composite materials were processed by casting followed by evaporation or freeze dried to obtain 2D films or 3D scaffolds, respectively (Figure 25C).

The obtained composite materials presented a bluish color due to the oxygen free radical-induced polymerization of Genipin and mainly due to its reaction with NH<sub>2</sub> groups on the CS backbone (Butler *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2000) and residual NH<sub>2</sub> groups on the chitin nanoforms. Different intensities of blue color were detected in the GCS, GCS/CHNC and GCS/CHNF materials (Figure S2.A). During the preparation of the GCS materials, all NH<sub>2</sub> groups of CS were engaged to covalently react with Genipin forming dark-blue materials; whereas, in the preparation of GCS/CHNC or GCS/CHNF materials, NH<sub>2</sub> groups of CS were also able to form intermolecular hydrogen bonds with the increasing number of hydroxyl groups on the surface of CHNC or CHNF forming pale-blue composite materials (Figure S2.A). This observation corroborates with transmittance profiles in the visible region (400-700 nm) displayed by the films (Figure S2.B and C). In these materials, a small absorbance peak appeared around 610 nm in the GCS film, which reduced with the introduction of CH nanoforms in these materials.

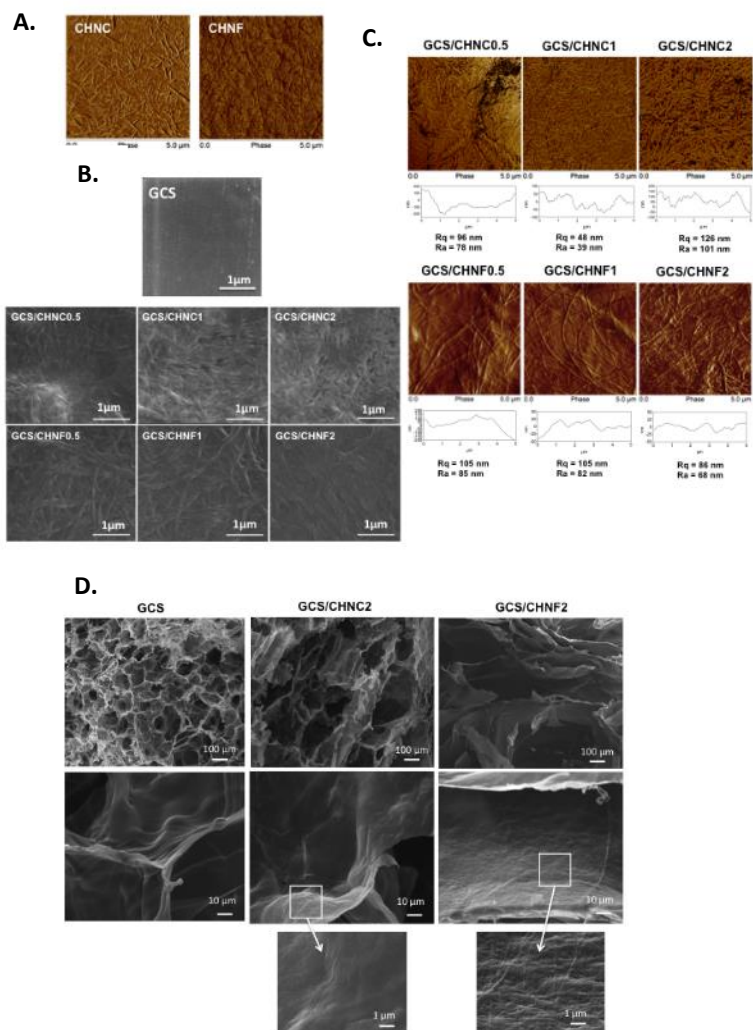
Often, the surface chemistry of a material dictates the adsorption of biological molecules onto its surface that modulates its degree of biocompatibility and response to cell adhesion and migration. As mentioned previously, CS and CH have a long history in biomedical applications due to their inherently bioactivity that regulates cell function. The presence of CH nanoforms in the Genipin-cross-linked materials was confirmed by ATR-FTIR (Figure S3.A) and XRD (Figure S3.B). Nonetheless, the quantity of CH nanoforms on the surface of these materials increased with its inclusion into the



GCS matrix. This was observed by the increase of the intensity of characteristic chitin bands (Figure S1.B and Figure S3.A) as observed in our previous studies (Salaberria *et al.*, 2015; Salaberria *et al.*, 2015; Salaberria *et al.*, 2015; Salaberria *et al.*, 2014). CHNC and CHNF are both interesting as building blocks for biomaterials and as biomaterial-cell response studies as they provide topography and stiffness as key elements of mechanotransduction for biomaterial-guided cell growth and differentiation (Crowder *et al.*, 2016). The properties of CHNC and CHNF (degree of crystallinity: 85% and 79% for CHNC and CHNF, respectively) are preserved during the in-house extraction procedures (Figure S1.C and Figure S3.B), (Salaberria *et al.*, 2015). Additionally, X-ray diffraction of the 2D films and 3D porous scaffolds (Figure S3.B) showed typical diffraction peaks of CS, CHNC and CHNF (Figure S1.C and Figure S3.B), indicating that both biopolymers retain their crystalline morphology in the composites after Genipin induced cross-linking. These results are comparable to those obtained for uncross-linked CS/CH nanocomposites (Mujtaba *et al.*, 2017; Sriupayo *et al.*, 2005) and CS/CH nanocomposites cross-linked with glutaraldehyde (Sriupayo *et al.*, 2005)

#### **IV.3.2.2 Morphology of the composite 2D films and 3D scaffolds (\*)**

SEM and AFM were used to analyze the morphology of the GCS/CHNC and GCS/CHNF composite materials. Cell-compatibility can be affected by the physical surface structure of the biomaterials and we will discuss this aspect in detail in the section on *in vitro* cell response. Selected SEM micrographs of the surface of GCS, and GCS/CHNC and GCS/CHNF composite films are shown in Figure 24B and further characterized for surface topography with AFM Figure 24C.



**Figure 24:** AFM images of chitin nanocrystals (CHNC) and chitin nanofibers (CHNF) (A); SEM pictures (x 25 000) (B); topographic AFM images using a magnification of 5x5 microns and corresponding typical surface height profiles (C); of GCS GCS/CHNC0.5, GCS/CHNC1 and GCS/CHNC2 and GCS/CHNF0.5, GCS/CHNF1 and GCS/CHNF2; and SEM pictures of the 3D porous scaffolds: GCS, GCS/CHNC2 and GCS/CHNF2 (D).

Physical characterization of the 2D films revealed that the introduction of both CHNC and CHNF influences the surface topology of the GCS film. The relatively smooth surface of the GCS film was etched by CH nanoforms resulting in surfaces roughness. When examined in detail, surfaces of the nanocomposite films consisted mainly of

randomly assembled CHNC (rod-like morphology;  $\varnothing=30$  nm and  $l=200$  nm) or CHNF (long and highly entangled nano-size fibrils;  $\varnothing=85$  nm and  $l=5$   $\mu\text{m}$ ) embedded within the GCS matrix. The images also provided evidence of well dispersed CHNC and CHNF in the matrix, without noticeable aggregates, even for samples with high CH nanoforms content (GCS/CHNC2 or GCS/CHNF2). These images indicate the excellent compatibility between the two constituents that results in homogeneous nanocomposite films. These results are in agreement with those obtained by us previously in uncross-linked CS/CHNC and CS/CHNF nanocomposite films (Salaberria *et al.*, 2015).

In the 3D scaffolds, it was observed, that incorporation of CHNC and CHNF into the nanoform-free GCS 3D scaffolds significantly increased their porosity (Table 6). This may be due to the lower degree of cross-linking between CS and Genipin which can result in an increase of the pore sizes, as observed in Figure 24D and listed in Table 6.

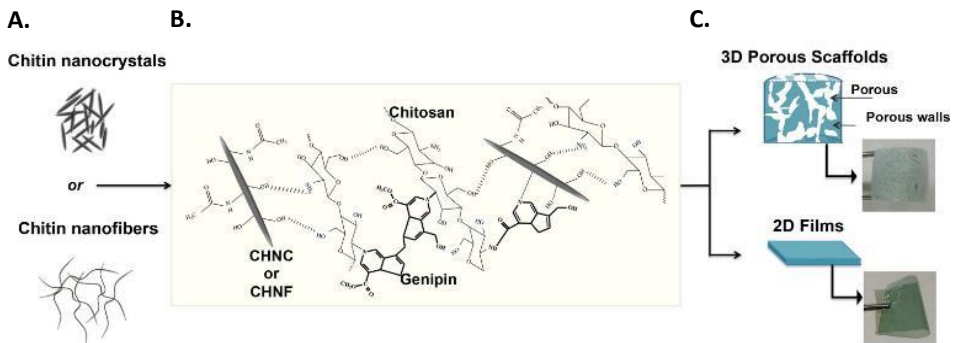
**Table 6:** General characterization of the GCS/CHNC and GCS/CHNF 3D porous materials.

<b>Samples</b>	<b>Pore size (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Porosity (%)</b>	<b>Water Uptake (%)</b>
GCS	$90 \pm 25$	$67 \pm 5$	$90 \pm 2$
GCS/CHNC0.5	$250 \pm 50$	$95 \pm 3$	$91 \pm 3$
GCS/CHNC1	$300 \pm 40$	$96 \pm 2$	$97 \pm 2$
GCS/CHNC2	$300 \pm 60$	$97 \pm 2$	$96 \pm 4$
GCS/CHNF0.5	$310 \pm 35$	$82 \pm 2$	$95 \pm 3$
GCS/CHNF1	$380 \pm 50$	$91 \pm 2$	$97 \pm 2$
GCS/CHNF2	$400 \pm 25$	$94 \pm 3$	$97 \pm 4$

The 3D scaffolds produced here demonstrated porosities in the range of 82–97% of the scaffold. Porosity greater than 70% in a scaffold is recommended for

cartilage regeneration to allow extracellular matrix-like (ECM) distribution as seen in the native cartilage (Temenoff and Mikos, 2000). Similarly, the porosity of bones varies from 3.5% for cortical canals to 80% in trabecular bone (Cardoso *et al.*, 2013). Therefore, the present 3D scaffolds could conceptually be applicable to both bone and cartilage tissue engineering.

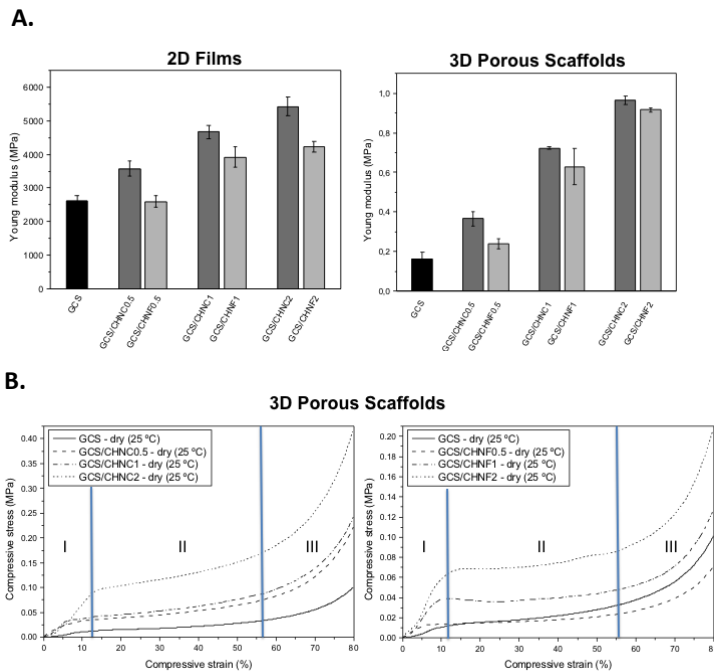
The SEM image of the 3D scaffolds (Figure 25C) presents their macroscopic template structure, and shows both the micro pores imparted by the freeze-drying method, and the roughness of the porous walls (as observed in the 2D films surfaces) arising from the presence of the nanocrystals and nanofibers (Figure 24). The average pore size changed from 90  $\mu\text{m}$  for GCS 3D scaffolds to 250 and 300  $\mu\text{m}$  for GCS/CHNC and 300 and 400  $\mu\text{m}$  for GCS/CHNF nanocomposites. This pore size is sufficient to allow nutrient and oxygen diffusion, and could permit intercellular communication through the matrix, as will be discussed later in the cell-response section.



**Figure 25:** Schematic Crosslinked Mechanism among Chitosan, Genipin, and  $\alpha$ -Chitin Nanocrystals or Nanofibers (A, B) to Form the 2D or 3D Materials (C).

### IV.3.2.3. Mechanical properties of the nanocomposite 2D films and 3D porous scaffolds (\*)

An ideal biomaterial should not only provide a compatible surface for cell adhesion and proliferation but also preserve its own structural integrity on cell invasion. Hence, the mechanical performance of a biomaterial is an important aspect to take into account for its design. Due to its promising mechanical properties, CH and in particular its nanofoms, have been studied for applications that require good structural integrity and display physical toughness, such as in cartilage and bone substitute materials. Figure 26 shows Young's modulus of the 2D and 3D materials prepared for this study, which were determined by tensile and compression tests, respectively (see complete characterization listed in Table 7).



**Figure 26:** Young's Modulus for the 2D films and 3D porous scaffolds determined with tension and compression tests, respectively (A); and compressive stress–strain curves of GCS, GCSCHNC and GCSCHNF. Curves are examples from 3 tests for each sample (B).

Compared with the nanoform-free GCS materials ( $\approx 2600 \pm 171$  MPa for GCS films; and  $\approx 0.16 \pm 0.04$  MPa for 3D porous scaffolds), the Young's modulus of the GCS nanocomposites is directly proportional to loading of CHNC (e.g.,  $\approx 5300 \pm 259$  MPa; and  $\approx 1.00 \pm 0.06$  MPa for GCS/CHNC2 films and 3D materials, respectively) and CHNF (e.g.,  $\approx 4100 \pm 197$  MPa and  $\approx 0.90 \pm 0.04$  MPa for GCS/CHNC2 films and 3D materials, respectively), as shown in Figure 26A. This indicates that the inclusion of CHNC and CHNF could significantly improve the bulk mechanical properties such as stiffness of both GCS 2D and 3D materials.

**Table 7:** Mechanical properties of the 2D films and 3D porous materials.

Samples	2D films		3D porous scaffolds	
	Young's Modulus	Elongation at Break	Compressive Modulus	Strain Recovery
	(Mpa)	(%)	(Mpa)	(%)
GCS	$2611 \pm 171$	$2.3 \pm 0.6$	$0.16 \pm 0.036$	$23.4 \pm 1.2$
GCS/CHNC0.5	$3578 \pm 215$	$1.3 \pm 0.2$	$0.37 \pm 0.035$	$27.0 \pm 2.8$
GCS/CHNC1	$4671 \pm 203$	$1.0 \pm 0.7$	$0.72 \pm 0.030$	$30.0 \pm 2.9$
GCS/CHNC2	$5432 \pm 284$	$0.9 \pm 0.2$	$0.96 \pm 0.032$	$31.6 \pm 2.1$
GCS/CHNF0.5	$2597 \pm 170$	$7.2 \pm 0.6$	$0.24 \pm 0.027$	$24.7 \pm 1.2$
GCS/CHNF1	$3914 \pm 306$	$3.4 \pm 0.2$	$0.63 \pm 0.090$	$27.8 \pm 2.9$
GCS/CHNF2	$4229 \pm 157$	$1.8 \pm 0.1$	$0.92 \pm 0.010$	$0.92 \pm 2.2$

As shown in our previous studies on the mechanical properties of uncross linked CS/CHNC and CS/CHNF composite films (Salaberria *et al.*, 2015), similar mechanical properties were found in the nanocomposite materials developed for this study. However, one significant difference was that the materials prepared in the present work, showed higher Young's moduli. This observation demonstrates that

when chemical cross-links are introduced, the physical chain entanglements within the polymeric chains are gradually replaced by a permanent covalent network that favors increase in storage modulus as is observed here. In general, composite materials prepared with CHNC showed better Young's modulus, which can be ascribed to better dispersion of nanocrystals in the GCS network as compared to CHNF. Also shown in Figure 26A and Table 7, the elongation at break decreased when the CH nanoforms were incorporated, which was attributed to the formation of the cross-linked network of hard domains (CH nanoforms), which restricts the mobility of the amorphous segments, decreasing the elongation at break. In addition, the values of elongation at break in general were also influenced by Genipin polymerization, *i.e.* the formation of cyclic cross-linking structures of Genipin cross-linked with CS matrix which are rigid and consequently less flexible (Wu *et al.*, 2017). However, all nanocomposite films showed adequate flexibility as shown in Figure 26A, GCS films, GCS/CHNC2 and GCS/CHNF2 nanocomposite films can be turned to a large angle (Figure 25).

The ability of these nanoforms to reinforce the structural integrity of 3D porous scaffolds was further evaluated through compression testing of the GCS materials with and without the inclusion of nanoforms. The compressive modulus and strength is expressed as compressive stress at 80% strain ( $\sigma_{80}$ ). The stress–strain curves were divided into three sections (Figure 26B): I – a linear elastic deformation at low stresses, II – cell collapse indicated by a small slope and III – densification at large strains (Varoni *et al.*, 2017) .

A considerable difference in the compressive behavior at large strains was observed for the 3D porous scaffolds with both CHNC and CHNF at the weight ratio of CS:CH nanoforms at 1:2. The nanoform-rich scaffolds were stiffer than those with lesser ratios of CS:CH nanoforms. The general mechanical properties of the GCS scaffolds with CS:CH nanoforms weight ratio at 1:2 performed better than the nanoform poor samples. In addition, the GCS scaffold with CHNF (CS:CH nanoforms weight ratio of 1:2) outperformed the scaffold with nanocrystals at the same ratio. This could indicate

stronger entanglements within the GSC scaffolds with higher CHNF contribution. Therefore, these results indicate that inclusion of CH nanofoms into the GCS matrix provides superior mechanical performance to the bulk CS matrix in both two and three dimensions.

#### IV.3.2.4 Water uptake of the 2D films and 3D porous scaffolds (\*)

The ultimate goal of any biomaterial is to serve as scaffolds, reservoirs of bioactive substances or to support cell and tissue regeneration in the human body. The ability to store water and undergo controlled swelling is a critical aspect of the ECM, which supports various extracellular activities and functions. This function is also important from the point of biodegradability through the action of native enzymes present in various bodily fluids. The presence of hydroxyl and amino groups on CS backbone allow this biopolymer to voluntarily hydrate in water as a result of strong interactions of water molecules with these hydrophilic groups. The cross-linking of CS matrix with Genipin has been proven to be a smart strategy for controlling water uptake and therefore modulating the swelling behavior of the hydrophilic CS matrix (Quentin *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017; Pangon *et al.*, 2016).

**Table 8:** General characterization of the GCS/CHNC and GCS/CHNF 2D films.

<b>Samples</b>	<b>Thickness (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Swelling (%)</b>
GCS	26 $\pm$ 5	97 $\pm$ 5
GCS/CHNC0.5	31 $\pm$ 7	91 $\pm$ 6
GCS/CHNC1	49 $\pm$ 8	88 $\pm$ 5
GCS/CHNC2	58 $\pm$ 8	45 $\pm$ 7
GCS/CHNF0.5	52 $\pm$ 1	93 $\pm$ 4
GCS/CHNF1	58 $\pm$ 5	67 $\pm$ 2
GCS/CHNF2	63 $\pm$ 2	49 $\pm$ 6



As listed in Table 8, the water uptake of the nanocomposite films depended directly on the CHNC and CHNF content. From GCS/CHNC0.5 to GCS/CHNC2 the water uptake decreased from 91% to 45%, and from GCS/CHNF0.5 to GCS/CHNF2 decreased from 93% to 49%, whereas for GCS film the water uptake value was consistent at 97.4%. Mathew *et al.* also obtained significantly lower swelling values with the presence of nanoentities in gluteraldehyde-cross-linked CS/CH nanocrystals composites and in GCS/graphene oxide composite films, respectively (Mathew *et al.*, 2009). The decrease in water uptake might be ascribed mainly to two factors: *i*) the reduction in the content of the free amino groups on CS backbone after the cross-linked reaction (the free amino groups are being used up during the cross-linking process); and *ii*) the incorporation of CHNC and CHNF to CS matrix.

Nonetheless, for the 3D porous scaffolds, the inclusion of CHNC and CHNF increased porosity and pore size of the materials, and consequently the water uptake in these materials increased only slightly compared with GCS, as shown in Table 6. In this case, the content of water in the materials was determined by the porosity and pore size of the 3D porous scaffolds.

Consequently, these results strongly indicate that inclusion of nanoforms into the GCS matrices can modulate the water uptake capacity and proportionately control the percentage of swelling in these composite materials, suggesting that these materials can be readily used in contact with tissues where reinforced scaffolds with vastly improved interactions with bodily fluids.

#### **IV.3.2.5 *In vitro* cell response of the 2D films and 3D porous scaffolds**

Cytotoxicity and cell adhesion tests were performed to assess the *in vitro* biocompatibility of the GCS nanocomposite materials, both 2D films and 3D porous scaffolds. For this, we used L-929 murine fibroblasts, a model system recommended by the ISO 10993-5 (Figures S.4 and S.5). Further, to investigate the effectiveness of these

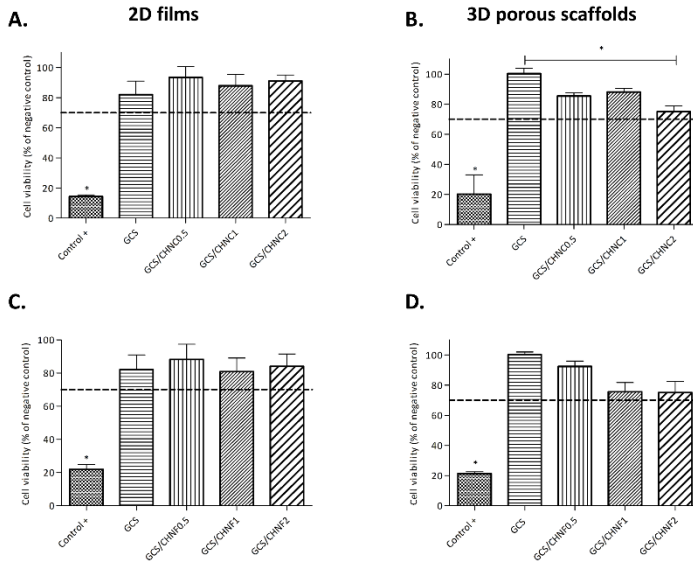
nanocomposite materials as instructive tissue engineering scaffolds, we used hASCs, one of the most employed cell type in tissue engineering.

##### *IV.3.2.5.1 Cytotoxicity evaluation of 2D and 3D nanocomposite materials*

The MTT assay using L-929 murine fibroblasts revealed that none of the biomaterials showed significant cytotoxic effect, as cell viability values ranged from 73% to 92% of the negative control (Figure S.4).

Similar results were obtained with hASCs cultured in the extractive media of the CH nanoform-free GCS materials (82 to 100% viability of the negative control value, in 2D films and 3D scaffolds, respectively). These results are in line with other studies using human MSCs seeded on CS-alginate scaffolds (Kumbhar and Pawar, 2016).

The addition of CH nanoforms to GCS matrices did not significantly affect hASC viability. Thus, GCS/CHNC and GCS/CHNF 2D films showed similar values, ranged from 83% to 94% of the negative control. Moreover, we did not find significant differences in the viability of cells cultured in extractive media from nanocomposite materials with different CH nanoform ratios (Figure 27A and 27C). Moving to the 3D porous scaffolds, cell viability also overcame 70% of the value of the negative control (limit of acceptance established by ISO) in all GCS/CH nanoform ratios. However, there is a reduction in cell viability, from 85% for GCS/CHNC0.5 to 75% for GCS/CHNC2 and from 93% for GCS/CHNF0.5 to 75% for GCS/CHNF2, as the CH nanoform ratios increased (Figure 27B and 27D). This effect may be due to the higher surface area of the 3D porous scaffolds exposed to the culture media, hence a higher release of constituents of the materials (including CH nanoforms), which may lead to a decrease in cell viability. Other authors have also reported similar reduction in cell viability with the higher CHNC concentrations relative to the CS weight (Liu *et al.*, 2016).



**Figure 27:** In vitro cell viability of hASCs cultured in media extracts from GCS and GCS/CHNC 2D films (A), GCS and GCS/CHNC 3D porous scaffolds (B), GCS and GCS/CHNF 2D films (C) and GCS and GCS/CHNF 3D porous scaffolds (D). Cell viability is expressed as Mean  $\pm$  SD, relative to the negative control. The broken line represents the limit of acceptance established by ISO 10993-5 (70% of the value of the negative control; \* $p < 0.05$ ).

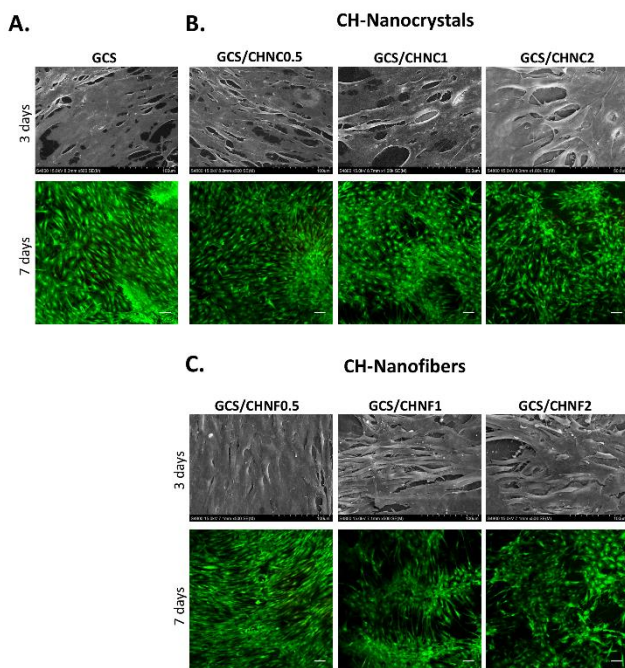
#### IV.3.2.5.2 Cell adhesion studies

A number of physicochemical factors such as water uptake (van Wachem *et al.*, 1985; Liu *et al.*, 2016), surface roughness (Faia-Torres *et al.*, 2014), mechanical properties (Leong *et al.*, 2003) and also the degree of deacetylation degree (DDA) are known to be key factors regulating cell adhesion. Indeed, it has been reported that human osteoblast-like cell line MG-63 showed an increased cell attachment when increasing DDA of CS films (Amaral *et al.*, 2012).

Adhesion capacity and viability of adherent cells are commonly evaluated by the formation of a monolayer of cells on the surface of the biomaterials. To assess this property, high-resolution SEM and *Live/Dead* fluorescence-based double staining were performed in both 2D films and 3D porous scaffolds.

We initiated our study with simple 2D films. Figure 28 shows hASCs adhesion on the 2D films GCS and GCS/CH nanoforms at 3 (SEM images) and 7 days (*Live/Dead* assay) after cell seeding. In the short time studies, hASCs began to form a monolayer of viable cells on the surface of the GCS 2D films, that was almost completely covered on day 7 (Figure 28A). These results are in line with observations reported by other authors showing good adhesion of hASCs in CS biomaterials (Gomathysankar *et al.*, 2016).

As discussed previously, the addition of CH nanoforms to the GCS material increased the surface roughness of the materials and enhanced its mechanical properties, being both necessary to promote cell adhesion and proliferation (Nishida *et al.*, 1983; De Mesquita *et al.*, 2012; Ifuku *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2016; Foster *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Rubentheren *et al.*, 2015).

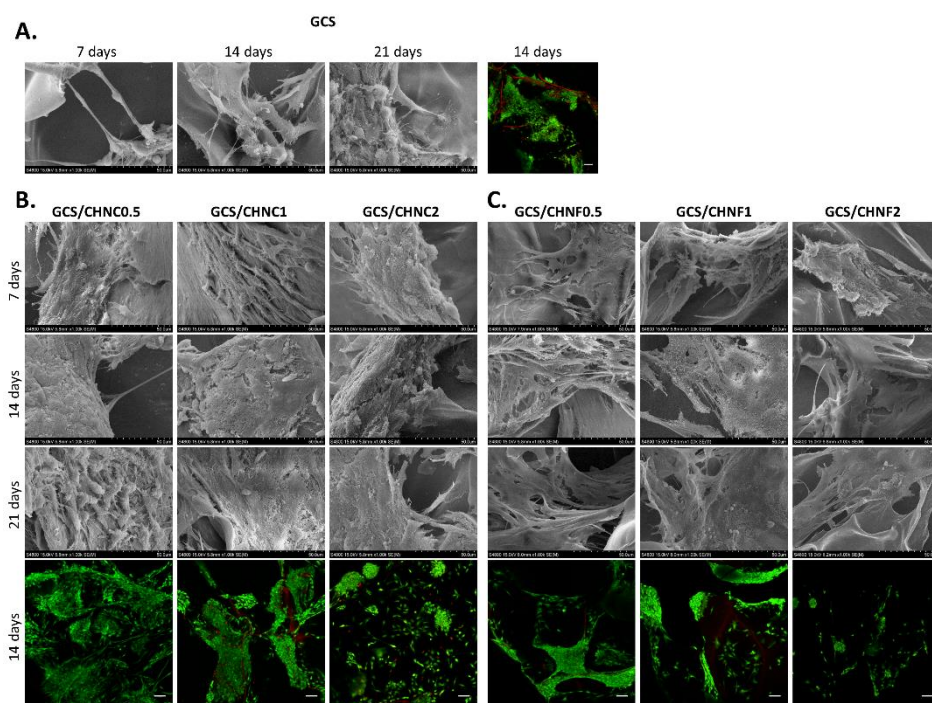


**Figure 28:** Adhesion of hASCs (SEM) and viability of adhered cells (*Live/Dead* assay) at 3 and 7 days, respectively, in contact with studied 2D films: GCS (A), GCS/CHNC (B) and GCS/CHNF (C). Scale bar in the fluorescence images represents 100 μm.

Indeed, our results showed that cells, both L-929 and hASCs, adhered well and were viable at 3 and 7 days of culture on the GCS/CHNC and GCS/CHNF materials, as demonstrated in Figure S.5 and Figure 28B and C. However, slight differences in hASCs morphology were found depending on the GCS bionanocomposite materials. Specifically, cells were more flattened when adherent to GCS/CHNC0.5 and GCS/CHNF0.5 (Figure 28B and 28C). Similar cell morphological adaptation had been reported on keratocytes seeded on high DDA CS coatings (Sun *et al.*, 2016).

*Live/Dead* images at 7 days of culture revealed a slight decrease in cell density when the CHNC and CHNF ratios were increased from 0.5 to 2. Comparing GCS/CHNC and GCS/CHNF materials, it can be observed higher surface covered by adhered cells on GCS/CHNC nanocomposites than on GCS/CHNF (Figure 28B and 28C).

For 3D porous scaffolds, we had chosen long time cell adhesion evaluation for SEM (7, 14 and 21 days) and for *Live/Dead assay* (14 days; Figure 29). The porous structure of 3D scaffolds expose higher surface area available for cell adhesion and requires more time to colonize the biomaterials. Thus, SEM images show that hASCs were able to attach onto the surface of the GCS 3D biomaterials and develop cytoplasmic projections allowing cells to penetrate through the pores. Moreover, we observed a progressive increase in the surface covered by cells due to adhesion and proliferation from 7 to 21 days (Figure 29A). A general view of the viability of adhered cells at 14 days is shown in *Live/Dead* images (Figure 29A), where most of the cells were attached and viable on the surface of the GCS 3D porous scaffolds. Cell adhesion was maintained in all the CH nanoform ratios, but as occurs in the cytotoxicity assay, a decrease in cell adhesion was observed when the CH nanoforms concentrations were increased (from 0.5 to 2).



**Figure 29:** hASCs adhesion (SEM) and viability of adhered cells (Live/Dead assay) in contact with studied 3D porous scaffolds: GCS (A), GCS/CHNC and (B) CHNF. Scale bar represents 100 μm in the fluorescence images.

As previously mentioned, cell adhesion and proliferation are closely linked to the physicochemical factors of the biomaterials, such as water uptake, mechanical properties, high stiffness, surface roughness, Young's Modulus, DDA and crystallinity (van Wachem *et al.*, 1985; Leong *et al.*, 2003; Panetti *et al.*, 2004; Majd *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2010; Bernardo *et al.*, 2012; Faia-Torres *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). The addition of CH nanoforms to the GCS base material improved these factors and, thus, cell adhesion and proliferation was enhanced at low CH nanoform concentrations.

It is necessary to take into account that the low CHNC and CHNF concentrations in both 2D films and 3D porous scaffolds leads to a higher CS amount and more NH<sub>2</sub> free groups available for cell adhesion. Such amino group availability

favors L-929 (Figure S.5) and hASCs adhesion to the GCS/CHNC0.5 and GCS/CHNF0.5 materials for both 2D films (Figure 28B and 28C) and 3D porous scaffolds (Figure 29B and 29C).

In addition to all the mentioned physicochemical factors, protein adsorption is an important step for cell adhesion as mediates cell attachment to a surface. Some studies have used fibronectin (FN) to investigate protein adsorption to various CS coating. FN is synthesized by stromal keratocytes after corneal injuries and also by MSCs during wound healing processes and its adsorption to different surfaces provides information to understand cell adhesion properties of the deacetylated CS materials. Previous literature indicates that biomaterials containing high NH<sub>2</sub> groups favored not only rabbit corneal keratocytes adhesion and proliferation, but also FN adsorption and integrin  $\beta$ 1 gene expression (Sun *et al.*, 2016). Related to this, surface roughness had also been suggested to facilitate FN adsorption. Moreover, the cell proliferation induced by surface stiffness was shown to be related to an increased integrin signaling expression due to focal adhesions (Panetti *et al.*, 2004; Rowlands *et al.*, 2008; Velzenberger *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2010). Furthermore, the nanoscale materials, as those presented in our study, also interact with proteins that control cell function and encourage cell adhesion, since protein adsorption is favoured ( Kilpadi *et al.*, 2001; Liu and Webster, 2007; Bostancioglu *et al.*, 2017).



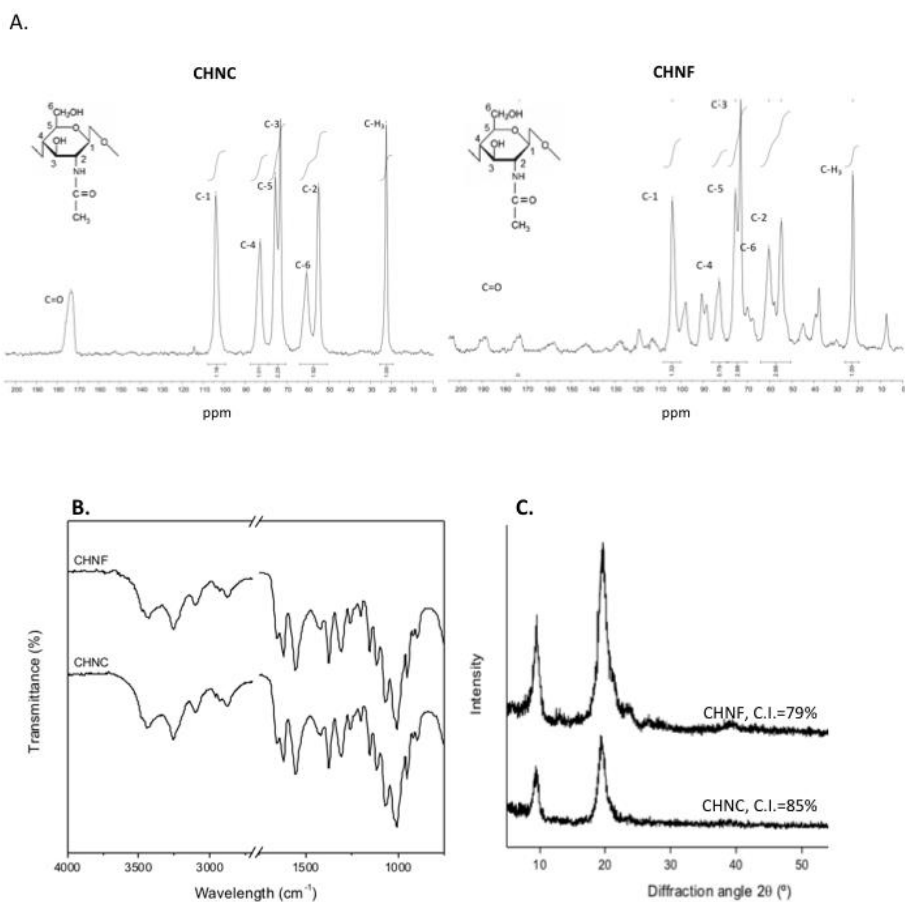






## IV.3.3 Supporting Information

## S1. Chitin nanocrystals (CHNC) and nanofibers (CHNF) characterization (\*)



**Figure S1:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of CHNC and CHNF (A); ATR-FTIR spectra (B) and X-ray diffraction (C) of CHNC and CHNF.

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum of CHNC and CHNF are shown in Figure S.1.  $^{13}\text{C}$  solid state cross-polarized magic angle spinning nuclear magnetic resonance ( $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR) spectra were recorded on a Bruker 400WB Plus spectrometer (U.S). Spectra were

collected by using a 4mm CP-MAS probe with a sample spinning rate of 10000 Hz. <sup>13</sup>C CP-MAS spectra at 100.6 MHz of the solid-state samples were obtained using 12 h spectral accumulation time, a time domain 2K points, a spectra width of 29 kHz, a contact time of 1.5 ms and an inter-pulse delay of 5 s.

The resonance areas corresponding to the carbon atoms of D-glucopyranosyl ring and to the methyl group (CH<sub>3</sub>) were between 58-105 ppm and at 24 ppm, respectively. The signals at δ=105, 84, 76, 74, 62 and 56 ppm were attributed to carbon C1, C4, C5, C3, C6 and C2 respectively of the D-glucopyranosyl ring, and the resonance at around δ=175 ppm is attributed to the carbonyl group (C=O).

The DDA of CH nanoforms was determined following the Kassai method (Kasaai, 2009), where the integral of methyl carbon (CH<sub>3</sub>) divided by the summation integrals of carbon atoms of the D- glucopyranosyl ring [C1–C6 atoms]. The DA was found to be 8 %, 3 % CHNC and CHNF, respectively, according to the equation (S1).

$$\begin{aligned} \text{DDA} &= 100 - 100 \times I_{\text{N-CH}_3} / [1/6(I_{\text{C}_1} + I_{\text{C}_2} + I_{\text{C}_3} + I_{\text{C}_4} + I_{\text{C}_5} + I_{\text{C}_6})] \\ &= 100 \times [1 - (I_{\text{N-CH}_3}) / (1/6 \sum I_{\text{main chain carbon}})] \quad (\text{S1}) \end{aligned}$$

Characteristic chemical shifts determined by ATR-FTIR of CHNF and CHNC: the two spectra are very similar to CH spectrum at 1619 and 1654 cm<sup>-1</sup> (amide I, singly H-bonded and doubly H-bonded, respectively), 1558 cm<sup>-1</sup> (amide II), 3253 cm<sup>-1</sup> (NH stretching band) and at 3433 cm<sup>-1</sup> (OH stretching band). 1556 cm<sup>-1</sup>, corresponding to NH bending (amide II) and at 1657 and 1620 cm<sup>-1</sup> assigned to carbonyl stretching (amide I) were also visible in the spectra (Brugnerotto *et al.*, 2001; Mi *et al.*, 2005; ).

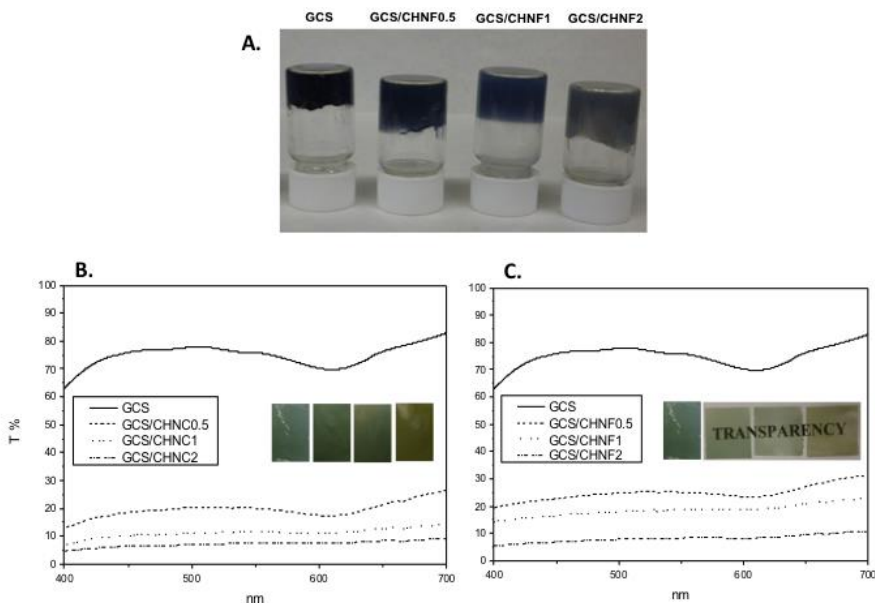
The difference of X-ray diffraction patterns of CHNC and CHNF in their common planes are due to their DDA (Zhang *et al.*, 2005). Both nanoforms exhibited typical α-

CH diffraction peaks at  $2\theta$  9.5°, 19.5°, 20.9° and 23.4° corresponding respectively with 020, 110, 120 and 130 crystallographic planes. (Ifuku et al., 2009b) The crystallinity index (C.I.) was calculated according to the Focher *et al.*, method (Focher *et al.*, 1990):

$$\text{C.I. (\%)} = [(I_{110} - I_{\text{am}})/I_{110}] \times 100 \quad (\text{S2})$$

where  $I_{110}$  is the maximum intensity (arbitrary units) of the 110 crystallographic plane and  $I_{\text{am}}$  is the amorphous portion diffraction, which usually is found about  $2\theta = 12.5 - 13.5^\circ$ . The crystallinity indexes of CHNC and CHNF were found to be 85% and 79%, respectively. The values are in agreement with our previous studies (Salaberria *et al.*, 2015).

**S2. General aspect of the materials (\*)**

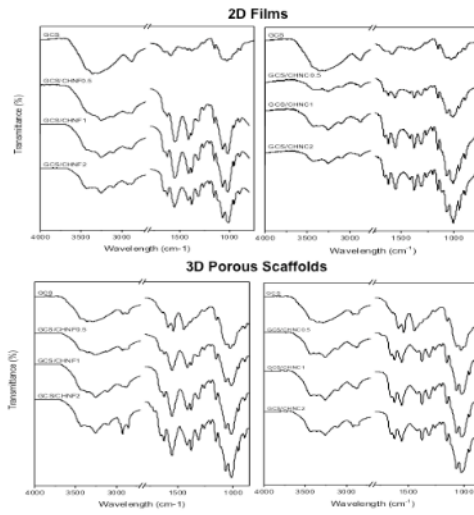


**Figure S2:** General aspect of the GCS and suspensions before their processing in 2D films or 3D porous scaffolds (A, GCS/CHNF suspensions as example). Transmittance profiles and photographs of GCS, GCS/CHNC0.5, GCS/CHNC1 and GCS/CHNC2 films (B); and GCS, GCS/CHNF0.5, GCS/CHNF1 and GCS/CHNF2 films (C, from left to right in both images).

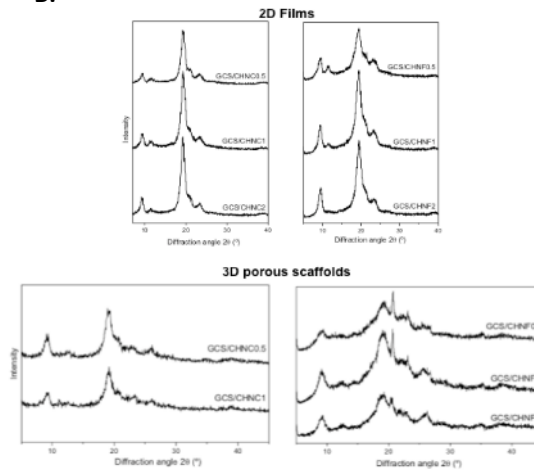
Transmittance profiles of the films decrease with the increase of the concentration of both CHNC and CHNF. These observations are in accordance with the photographs of the translucent films. The light transmittance spectra of the films were assessed using a Shimadzu UV-3600 UV-VIS-NIR spectrophotometer. Spectra were recorded at room temperature in steps of 1 nm in the range of 400–700 nm.

**S3. Characterization of the bionanocomposite materials: GCS/CHNC and GCS/CHNF (\*)**

**A.**



**B.**



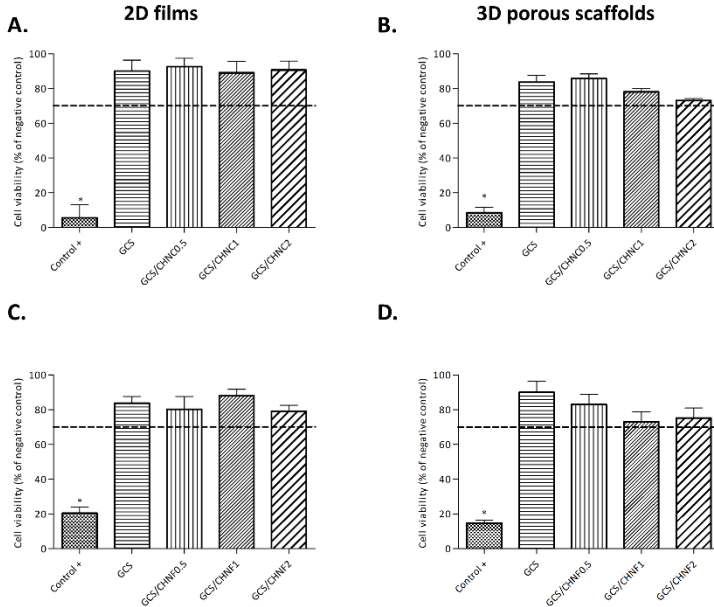
**Figure S3:** ATR-FTIR spectra (A) and X-ray diffraction profiles (B) of GCS, GCS/CHNC and GCS/CHNF of the 2D films and 3D porous scaffolds.

The expected characteristic absorption bands formed by cross-linking CS with genipin, at 1547 and 1652  $\text{cm}^{-1}$ , attributed to the formation of a tertiary amine and a secondary amide (Rinaudo, 2006; Kawadkar and Chauhan, 2012), respectively, were not detected by ATR-FTIR. Because the cross-linking occurred at small extent, and consequently, these vibrations were overlapped by the large and intense characteristic band of chitosan in this region (Brugnerotto *et al.*, 2001). CS main characteristic absorption bands (spectra not showed) appear at: 1650 and 1586  $\text{cm}^{-1}$ , assigned to the amide I and amide II vibrations, respectively; 3450  $\text{cm}^{-1}$ , attributed to the axial stretching of the O-H and N-H bonds; 2860  $\text{cm}^{-1}$ , assigned to the axial stretching of C-H bonds; and at 1150–897  $\text{cm}^{-1}$  due to the presence of glycosidic bonds (C-O and C-O-C stretching) (Brugnerotto *et al.*, 2001). Regarding the GCS/CHNC and GCS/CHNF materials, compared to the GCS spectrum, the spectra exhibited well-defined absorption signals that are characteristic of chitin at 3437, 3260 and 3108  $\text{cm}^{-1}$ . These bands are assigned to the axial stretching of the O-H and N-H bonds. In addition, the absorption bands at 1556  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to NH bending (amide II) and at 1657 and 1620  $\text{cm}^{-1}$  assigned to carbonyl stretching (amide I) were also visible in the spectra (Salaberria *et al.*, 2015).

X-ray diffractograms of the Genipin-cross-linked bionanocomposite films showed typical diffraction peaks of CS, CHNC and CHNF at  $2\theta$  9.5°, 19.5°, 20.9° and 23.4° corresponding respectively with 020, 110, 120 and 130 crystallographic planes (Ifuku *et al.*, 2009).



#### S4. Cytotoxicity assay of the L-929 murine fibroblasts in contact with the extractive media of the bionanocomposites

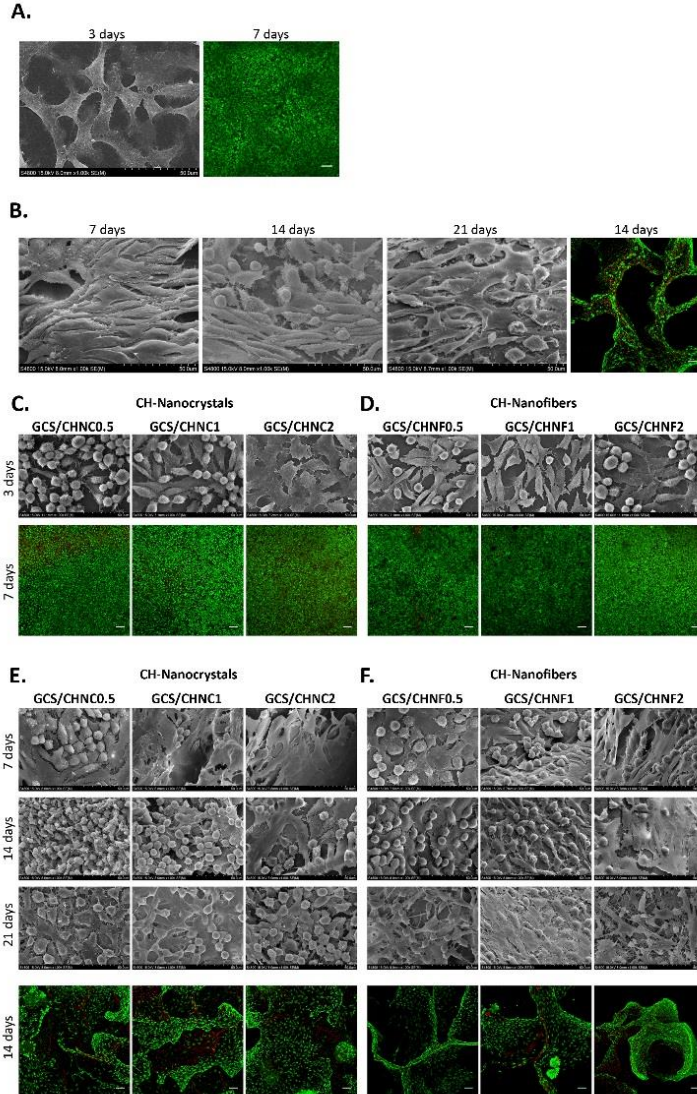


**Figure S4:** *In vitro* cell viability of L-929 murine fibroblasts cultured in the extractive media from GCS and GCS/CHNC 2D films (A), GCS and GCS/CHNC 3D porous scaffolds (B), GCS and GCS/CHNF 2D films (C) and GCS and GCS/CHNF 3D porous scaffolds (D). The results are expressed as Mean  $\pm$  SD, relative to negative control (high-density polyethylene). The broken line represents the 70% of the value of the negative control (\* $p < 0.05$ ).

L-929 murine fibroblasts cytotoxicity assay (MTT assay) was performed 24 hours after the cells were cultured in the extractive media obtained from both 2D films and 3D porous scaffolds, according to the ISO 10993-5 recommendations. The results revealed that none of the biomaterials showed cytotoxic effect, as cell viability values overcame the established acceptance limit of 70% of the value of the negative control. The addition of CH nanoforms to GCS 2D film resulted in similar proliferation values in all the CHNC (Figure S4.A) and CHNF concentrations (Figure S4.C). However, L-929 fibroblasts showed a slight decrease in cell viability from the lowest to the highest CH

nanoform concentration (from 0.5 to 2), when cultured in the extractive media from both GCS/CHNC (Figure S4.B) and GCS/CHNF (Figure S4.D) 3D porous scaffolds.

**S5. L-929 murine fibroblasts adhesion and viability studies in contact with the bionanocomposites**



**Figure S5:** L-929 murine fibroblast adhesion (SEM) and viability of adhered cells (Live/Dead staining) in contact with GCS 2D films (A), GCS 3D porous scaffolds (B), GCS/CHNC (C) and GCS/CHNF (D) 2D films, GCS/CHNC (E) and GCS/CHNF (F) 3D porous scaffolds. Scale bar represents 100  $\mu\text{m}$  in fluorescence images.

Short time cell adhesion was evaluated on 2D films at 3 (SEM images) and 7 days (*Live/Dead* staining). The results revealed that L-929 murine fibroblasts adhered onto the GCS 2D film and started to colonize the surface of the biomaterial at day 3 (Figure S5.A).

The addition of CH nanoforms to the GCS 2D films improved cell morphology and enhanced cell proliferation and adhesion compared to the GCS nanoform-free materials. Moreover, GCS/CHNC presented slight higher L-929 cell adhesion compared to GCS/CHNF, as can be seen in the SEM micrographs (Figure S5.C and D, respectively).

*Live/Dead* staining at 7 days showed homogeneous cell distribution along the GCS (Figure S5.A) and 2D bionanocomposite films (Figure S5.C and D), covering the whole area of the biomaterial. However, no differences were observed between GCS/CHNC and GCS/CHNF in any of the used concentrations (Figure S5.B and C, respectively).

In a second set of experiments, long-time adhesion and viability to the 3D porous scaffolds was evaluated by SEM at 7, 14 and 21 days and by *Live/Dead* at 14 days (Figure S5. B, E and F). As occur in 2D films, L-929 cells adhered, proliferated and spread onto the surface of the GCS (Figure S.5B), GCS/CHNC (Figure S5.E) and GCS/CHNF (Figure S5.F) 3D porous scaffolds. SEM analysis of 3D porous scaffolds, showed a progressive increase in cell density from day 7 to 21 in all the GCS, GCS/CHNC and GCS/CHNF biomaterials, completely covering the exposed surface at this last time point (Figure S5.B, E and F). The addition of CH nanoforms to the GCS material provided a better substrate for cell adhesion, as higher cell density was observed when compared to GCS nanoform-free scaffolds. Moreover, both GCS/CHNC (Figure S5.E) and GCS/CHNF materials (Figure S.5F) showed a uniform cell adhesion, proliferation and distribution. Furthermore, L-929 adhesion was homogeneous in all the range of CH nanoform concentrations (from 0.5 to 2) and no differences were observed among them. The viability of the adhered cells in the 3D porous scaffolds reveals that L-929 cells were viable in contact with all the biomaterials studied (Figure S5.B, S5.E and S5.F).

To sum up, we can conclude that: *i)* L-929 murine fibroblasts were able to adhere and proliferate in all the GCS, GCS/CHNC and GCS/CHNF 2D films and 3D porous scaffolds; *ii)* the addition of CH nanoforms improved cell morphology and adhesion in all the materials and *iii)* there was a higher cell adhesion and proliferation on the GCS/CHNC materials, compared to the GCS/CHNF, in both 2D films and 3D porous scaffolds.









**IV.4 Chapter IV. Chondrogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells spheroids cultured in hypoxia using a chitosan/chitin nanocrystals 3D porous scaffold as platform for cartilage tissue engineering**



## **IV.4 Chapter IV. Chondrogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells spheroids cultured in hypoxia using a chitosan/chitin nanocrystals 3D porous scaffold as platform for cartilage tissue engineering**

### **IV.4.1 Materials and methods**

#### **IV.4.1.1 Synthesis of the CS/CHNC 3D porous scaffold**

CS/CHNC 3D porous scaffolds were prepared by freeze-drying method, following the approach described in our previous work (Zubillaga *et al.*, 2018) Briefly, first a CS (DDA = 98% and 500 000 g mol<sup>-1</sup> from Mahtani Chitosan PVT. LTD., India) solution at 1.0% w/v was prepared using 1.0% v/v aqueous acetic acid (99%, ReagentPlus) under vigorous stirring at 25 ± 1°C for 48 h. After dissolution, 0.5% w/w of Genipin ( ≥98%, Sigma-Aldrich Europe), proportionate to the dry weight of CS, was added and stirred at 25 ± 1°C for 15 min. Then, never-dried CHNC (prepared in-house<sup>25</sup> from CH powder as of lobster exoskeletal, kindly supplied by Antarctic Seafood S.A., Chile), with a weight ratio CS:CHNC of 1:0.5, were added and dispersed using an Ultra-Turrax equipment at 20,000 rpm for 30 min. Finally, the 3D porous scaffolds were prepared by transferring the suspension into cylindrical containers followed by storage at 40°C for 24 h to create the cross-linking reaction and subsequently frozen at -20°C for 72 h. Thereafter, the samples were lyophilized using a Christ, Alpha 1-4 LDplus (Germany) equipment with a condenser temperature of -55°C for 4 days. The ensuing samples were trimmed to become 3D porous scaffolds with the apparent size of 4.5 cm height and 3.0 cm diameter. The samples were kept in a conditioning cabinet at 50% RH and 25°C to ensure the stabilization of their water content.

#### **IV.4.1.2 hASCs spheroids formation and chondrogenic differentiation**

hASCs, kindly supplied by Histocell SL. (Zamudio`s Scientific Park, Biscay, Spain), were maintained in CM containing Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)-

Glutamax™ (Gibco, Paisley, UK), supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Lonza, Verviers, Belgium) and 10% fetal bovine serum (Biochrom AG, Berlin, Germany).

In order to obtain hASCs spheroids, the *hanging-drop* technique was used. This method allows spontaneous cell aggregation by culturing cell suspensions on the inner side of tissue culture dishes. Briefly, drops of 30  $\mu\text{L}$  of CM containing  $15 \times 10^3$  cells were seeded on the cover of a plastic petri dish (J.D Catalán, Spain) and allowed aggregate over 48 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . After this time, two spheroids per well were transferred into a 24-well ultralow attachment culture plate (Corning NY, U.S) and 200  $\mu\text{L}$  of the CM were added to each well in the case of control group. For chondrospheroids (chondrogenic differentiation group), samples were washed in sterile PBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S) and 200  $\mu\text{L}$  of the CIM (STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit; Gibco, Paisley, UK) supplemented with gentamicin (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, U.S) were added. Both type of spheroids were maintained for 7, 14 and 21 days under either normoxia (20%  $\text{O}_2$ ) or hypoxia (5%  $\text{O}_2$ ) conditions. The media was replaced twice a week.

#### **IV. 4.1.3 hASCs spheroids volume quantification**

hASCs spheroids from the control group and chondrospheroids cultured in normoxia and hypoxia conditions were imaged on days 7, 14 and 21 days using IC Capture 2.3 program under a phase-contrast microscope (Nikon Eclipse TS100, Tokyo, Japan). Spheroids radius ( $r$ ) were measured using a computer-based image analysis system (Image J, NIH, U.S) and the volume was calculated assuming perfect spheres ( $n_{\text{spheroid}}=50$ ).

#### IV.4.1.4 hASCs spheroids viability

In order to evaluate hASCs spheroids viability, a *Live/Dead* assay was performed. Control group spheroids and chondrospheroids cultured at 7, 14 and 21 days under normoxia and hypoxia conditions were washed in 1X PBS and incubated for 15 min at 37 °C with 4 μM of calcein-AM (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S) and 5 μM propidium iodide (Molecular Probes, Eugene, OR) in PBS. Samples were observed under a confocal microscope (Olympus LV500, Japan) to visualize viable (green fluorescence;  $\lambda_{ex}\text{-}\lambda_{em}=490\text{-}515$  nm) and dead (red fluorescence;  $\lambda_{ex}\text{-}\lambda_{em}=490\text{-}630$  nm) cells.

#### IV.4.1.5 Histology and immunodetection

For histological analysis and immunodetection, all spheroids were harvested at 7, 14 and 21 days, washed in 1X PBS and fixed in paraformaldehyde 4% (PanReac AppliChem, Barcelona, Spain) for 20 min at room temperature. Fixed spheroids were washed in 1X PBS, embedded in 1% agarose (Conda, Madrid, Spain) in PBS to facilitate the handling and fixed again in paraformaldehyde 4% for 1 h at 4°C. Then, samples were dehydrated with serial concentrations of ethanol (50-100%), immersed twice in methyl benzoate (VWR Chemicals, Leuven, Belgium), citrosol (PanReac AppliChem, Barcelona, Spain) and embedded in paraffin wax (Fibrowax™ VWR Chemicals, Leuven, Belgium). Histological sections of 5 μm thickness were immersed in citrosol and rehydrated in a series of ethanol followed by washing in tap water for 5 min.

For collagen detection, histological sections were stained with Masson's trichrome (stained in blue to green), and for the detection of sGAG, samples were stained with safranin-O (0.1% w/v) and alcian blue (1% w/v; both from Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S), where sGAG were stained orange to red and blue, respectively. As a histological reference, H/E (both from Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) was also performed. After the staining, all sections were dehydrated, followed by three times

immersed in citrosol for 5 min and mounted with a cover slip containing DPX mountant (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S).

Immunodetection of COL2A1 and ACAN was performed by treating paraffin sections with 0.1% hyaluronidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S) in PBS for 10 min at 37°C as antigen retrieval. The slides were then incubated for 30 min with peroxidase blocking solution consisting of 3% of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PanReac AppliChem, Barcelona, Spain) in distilled H<sub>2</sub>O and rinsed with 1X PBS prior to permeabilization with 0.1% Triton (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S) in PBS (PBS-T). Non-specific bindings were blocked in 5% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S) and 10% goat serum (Life Technologies, New Zealand, Australia) in PBS-T for 1 h at room temperature. COL2A1 and ACAN mouse monoclonal primary antibodies (both from Santa Cruz Biotechnology, Dallas, U.S) at a 1:50 dilution were incubated at 4°C overnight. Then, slides were incubated with anti-mouse polyvalent peroxidase conjugate secondary antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S) at a 1:100 dilution for 2 h followed by washing three times with 0.1% PBS-T. The sections were incubated with diaminobenzidine (DAB Quanto; Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) chromogen and substrate-buffer solution (1 drop of DAB + 1 mL of substrate-buffer) followed by rinsing with tap water. Slides were dehydrated and mounted with a cover slip containing DPX mountant. The samples were examined by bright field light microscope (Olympus BX50) and images were taken using Cell<sup>A</sup> program (Olympus Soft Imaging Solutions).

##### **IV.4.1.6 Western blot**

Control group and chondrospheroids cultured under normoxia and hypoxia conditions were collected at 7, 14 and 21 days and washed in 1X PBS. After, 200 µL of Laemmli buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S) were added and samples were lysed by sonicating with three pulses of 30 s (Sonopuls, Berlin, Germany). The protein concentration was determined using the method for protein assay based in the trichloroacetic acid (TCA), described previously by other authors (Karlsson *et al.*, 1994).

Equal amounts of protein (10 µg) were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham™ Protram™, GE Healthcare, Life Science, Germany) for 3 h at 380 mA. Membranes were blocked in 5% skimmed milk for 1 h at room temperature and subsequently incubated with COL2A1, ACAN (both at 1:200) and HIF-1α (BS Bioscience U.S; 1:250) anti-mouse and COL1A2 (Genetex, Barcelona, Spain, 1:1000) and β-actin (EDM Millipore, Temecula, U.S 1:5000) anti-rabbit primary antibodies at 4°C overnight. Then, the membranes were incubated with goat anti-mouse-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, U.S; 1:1000) and donkey anti-rabbit-HRP secondary antibodies (EDM Millipore, Temecula, U.S; 1:1000) for 1 h at room temperature. Membranes were visualized using Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate (EDM Millipore, Temecula, U.S), and images acquired with the gel documentation system G:BOX chemi HR16 (Syngene, Frederick, U.S). The relative protein expression levels were normalized to that of their corresponding loading control β-actin. As an internal control of the western blot, human foreskin fibroblasts (HFF) expressing COL1A2 were used.

#### **IV.4.1.7 hASCs spheroids adhesion and viability in the CS/CHNC 3D porous scaffold**

The CS/CHNC 3D porous scaffolds (0.3 cm<sup>3</sup>) were sterilized in 70% ethanol for 2 h, washed three times in sterile 1X PBS, placed in a 24 well-plate ultralow attachment plate (Corning NY, U.S) and pre-wetted in CM for 24 h at 37°C. Drops of 15 µL of CM containing 20 spheroids were seeded onto scaffolds and allowed to adhere for 5 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

Cell adhesion and viability of adherent spheroids on the CS/CHNC 3D porous scaffolds were evaluated by SEM and *Live/Dead* assay. Firstly, samples were cultured for 7 days in CM either in normoxia or hypoxia conditions. From the results obtained, samples were subsequently cultured only under hypoxia at the following conditions: i)

7, 14 and 21 days in CM, *ii*) 7, 14 and 21 days in CIM, *iii*) 21 days in CM followed by 14 days in CIM, and *iv*) 35 days in CIM. For SEM analysis all samples were rinsed three times in Sorensen buffer (PanReac AppliChem, Barcelona, Spain), fixed using 2% glutaraldehyde (PanReac AppliChem, Barcelona, Spain) for 2 h, washed in Sorensen buffer, dehydrated using a series of gradient ethanol solutions and dried in hexamethyldisilazane (Scanning Electron Microscopy, Hatfield, U.S) for 10 min. The samples were sputtered with a thin layer of gold under an argon atmosphere and observed using a Hitachi S-4800 scanning electron microscope with an accelerating voltage of 10 kV.

Additionally, to assess hASCs spheroids viability in contact with the CS/CHNC 3D porous scaffolds a *Live/Dead* assay was performed as described previously.

#### **IV.4.1.8 Chondrogenic differentiation in the CS/CHNC 3D porous scaffolds**

In order to determine chondrogenic differentiation of spheroids into the CS/CHNC 3D porous scaffolds, we quantified the sGAG content in both 35 days culture experimental groups.

Samples were harvested, washed with 1X PBS and digested with 125 µg/mL papain extraction reagent in 0.2 M sodium phosphate buffer, 400 mg sodium acetate, 200 mg ethylenediaminetetraacetic acid and 40 mg cysteine HCl for 3 h at 65°C. The digested extracts were centrifuged at 10,000 g for 10 min and the supernatants were collected. sGAG content was determined by 1,9-dimethylmethylene blue colorimetric assay (Blyscan sGAG assay Kit, Biocolor, Northern Ireland, UK) according to the manufacturer's protocol. The absorbance of each solution was measured at 655 nm (Synergy HT spectrophotometer, Biotek, U.S). The amount of sGAG was normalized to the DNA content for each sample, determined using DNA Quantitation Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S).



#### **IV.4.1.9 Statistical analysis**

For the statistical analysis, Student's *t*-test, one-way and two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a *post hoc* Bonferroni correction were used. Experiments were carried out three times in triplicate for each condition. The results are expressed as Mean  $\pm$  SD and values of  $p < 0.05$  were considered to be statistically significant.

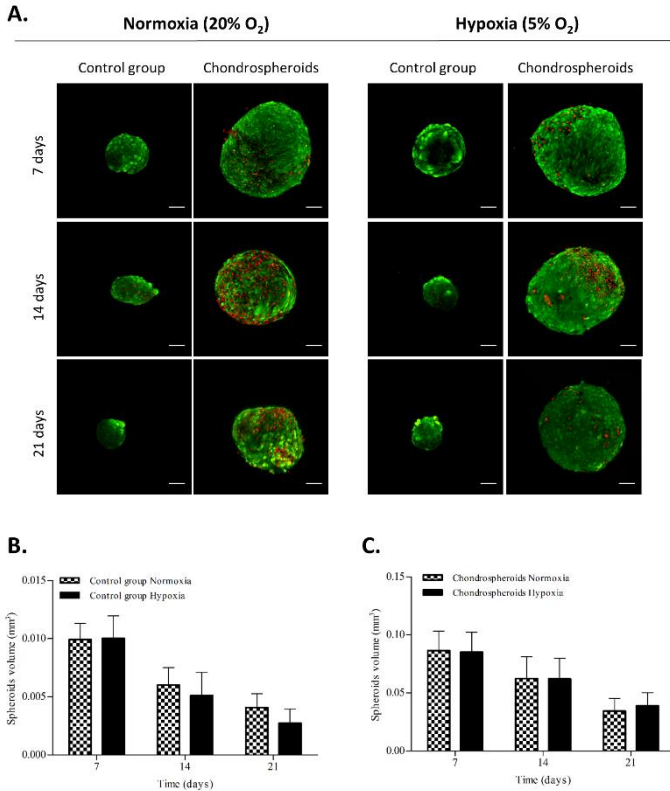
#### **IV.4.2 Results and discussion**

##### **IV.4.2.1 hASCs spheroids 3D model characterization**

Articular cartilage degeneration is one of the main target for TE, for which the hMSCs (Suzuki *et al.*, 2012) and, in particular, hASCs have been reported to be one of the principal cell sources (Yoon *et al.*, 2012; Kasir *et al.*, 2015). We generated hASCs spheroids as they provide a controlled spatial organization of hASCs, recapitulating crucial events occurring during morphogenesis (Marga *et al.*, 2007) The *hanging-drop* culture technique employed in this work, has been previously used for generating chondrocytes 3D structures (Martínez *et al.*, 2008) and small pieces of cartilage (Ruedel *et al.*, 2013)

We observed that hASCs spheroids displayed compact rounded cell aggregation that maintained their physical structure during all the investigation time (Figure 30A). In order to assess the suitability of this hASCs 3D culture model, volume quantification and cell viability studies were done. The results from the *Live/Dead* assay showed viable cells (stained in green) in the surface of the spheroids in all the experimental groups and measured times. However, at 14 days of culture there were a higher number of dead cells (stained with red fluorescence) in normoxia cultured spheroids compared those cultured in hypoxia. These results are in line with other authors which showed that hASCs cultured in hypoxia exhibited better growth and survival (Stubbs *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2014; Kakudo *et al.*, 2015), with a reduced presence of apoptotic events (Choi *et al.*, 2017).

The hASCs spheroid volume quantification gives an approach of cell proliferation, matrix deposition and the intercellular space (Martínez *et al.*, 2008). Concerning their size, chondrospheroids had higher volume values compared to the control group ( $0.061 \pm 0.016$  vs  $0.0066 \pm 0.014$  mm<sup>3</sup>, respectively, in the case of normoxia cultures, and  $0.062 \pm 0.0017$  vs  $0.0059 \pm 0.0012$  mm<sup>3</sup> in hypoxia cultures) (Figure 30B and C), but there were no differences in size between normoxia and hypoxia conditions. Moreover, from 7 to 21 days of culture there was a shrinking trend in the volume of both, chondrospheroids and spheroids of the control groups (a volume reduction of  $64.6 \pm 15.67\%$  vs  $66.00 \pm 8.87\%$ , respectively, in normoxia, and  $54.2 \pm 15.73\%$  vs  $71.11 \pm 15.8\%$ , in hypoxia). These outcomes are in line with other authors reporting similar size decrease due to the intense cell-cell contacts compaction in the spheroids and the retracting forces exerted by the cells on the ECM fibrils (Hoyer *et al.*, 2014).



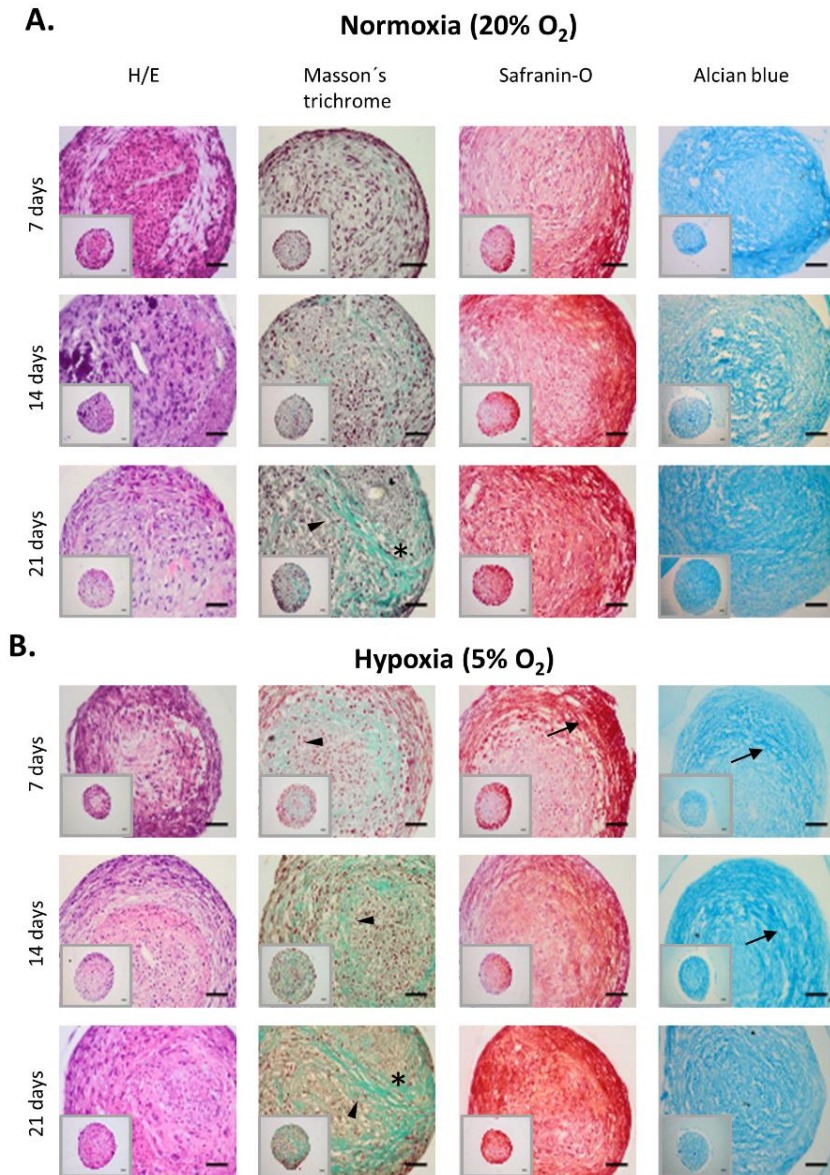
**Figure 30:** hASCs spheroids characterization in normoxia or hypoxia conditions at 7, 14 and 21 days in terms of (A) cell viability (Live/Dead assay) and volume quantification of (B) control group and (C) chondrospheroids. The scale bar represents 100  $\mu\text{m}$ .

#### IV.4.2.2 Evaluation of the chondrogenic differentiation in hASCs spheroids

The differentiation level of the chondrospheroids was evaluated by histological staining, immunodetection and western blot analysis. The histological evaluation showed good cartilage-like features in terms of ECM deposition (collagen and sGAG) in both normoxia and hypoxia conditions, with an intense staining through the pellet from 7 to 14 and 21 days of culture (Figure 31). Furthermore, Masson's trichrome and alcian blue staining showed higher chondrogenic differentiation at 7 days of culture under hypoxia (Figure 31B) compared to normoxia (Figure 31A). However, at 21 days of the

chondrogenesis, the collagen and sGAG deposition were similar in all the spheroids. At this time, high magnification images from Masson's trichrome staining showed hASCs inside the spheroids surrounded and isolated by the collagen fibrils they had secreted during their chondrogenic differentiation.

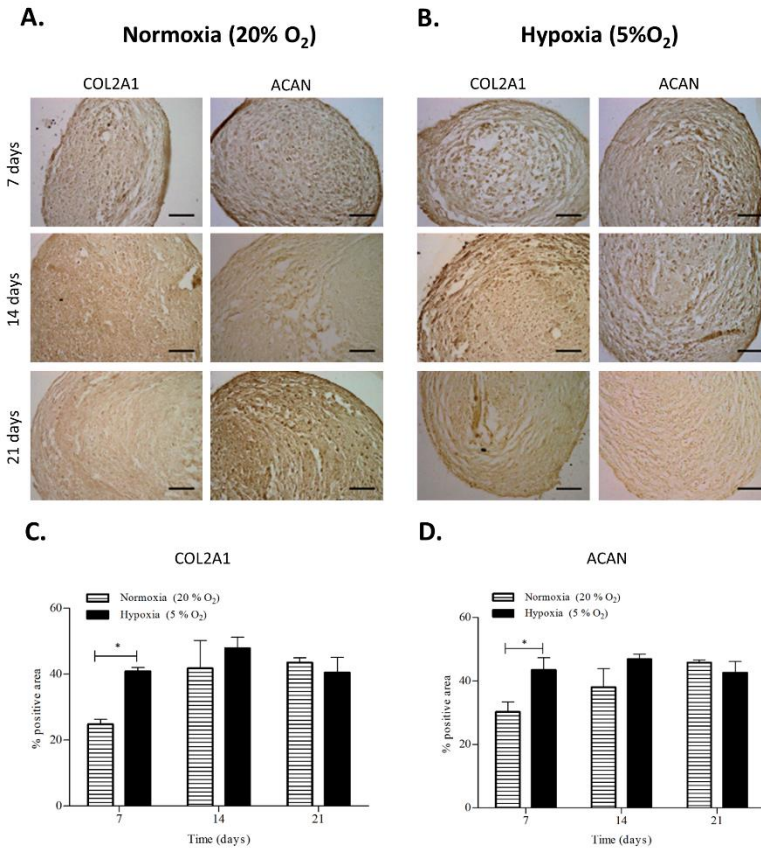
Some authors have reported specific microenvironment and geometry inside the spheroids, which comprises proliferating, quiescent and necrotic regions (Cui *et al.*, 2017). Thus, different mass transport rates for nutrients, O<sub>2</sub>, ATP, waste, CO<sub>2</sub> and lactase are presented in the multilayer structure inside the spheroid. We have also observed similar region distribution in our spheroids. The safranin-O and alcian blue staining revealed an intense and circle-shape sGAG deposition from the periphery (proliferating zone) towards the core of the spheroid (Figure 31A and B). Same sGAG distribution pattern had been previously described in the periphery of MSCs spheroids during chondrogenic differentiation (Goude *et al.*, 2014). In the case of the collagen synthesis, we have observed a predominant distribution in the center of the spheroid at early stages of the chondrogenic differentiation (7 and 14 days). However, as the chondrogenesis went on, thick and heavily stained collagen fibers can be seen across the center and the periphery of the spheroids (Figure 31). Other authors have reported similar collagen distribution in the middle zone of the spheroids (Markway *et al.*, 2010; Schon *et al.*, 2012).



**Figure 31:** Histological staining of hASCs chondrospheroids cultured at 7, 14 and 21 days under (A) normoxia (20% O<sub>2</sub>) and (B) hypoxia (5% O<sub>2</sub>) conditions. Periphery of the spheroids: arrows mark sGAG distribution. Central region of the spheroids: arrowheads mark collagen distribution and (\*) marks chondrocyte-type cells surrounded by ECM. The scale bar represents 50 μm.

#### IV. Methodology and results of the experimental work

Furthermore, the immunodetection of the cartilage specific markers, COL2A1 and ACAN, demonstrated high expression of both proteins in the spheroids (Figure 32A and B). As occurred with the histological sections (Figure 31), there was a significant higher COL2A1 y ACAN expression under hypoxia conditions at the early time of 7 days, which was maintained at 14 and 21 days of culture. In the normoxia group, the maximum in the chondrogenic differentiation was delayed until 14 days. From this time on, there were no statistically significant differences compared with the hypoxia group (Figure 32C and D).



**Figure 32:** Bright field images of the hASCs chondrospheroids stained with COL2A1 and ACAN at 7, 14 and 21 d under (A) normoxia (20% O<sub>2</sub>) and (B) hypoxia (5% O<sub>2</sub>) conditions. Quantification of the percentage of area in the spheroids marked by (C) COL2A1 and (D) ACAN expression (\*p<0.05; two-way ANOVA). The scale bar represents 50  $\mu$ m.

To add further support to the observations found by histological and immunodetection, the chondrogenic differentiation was also evaluated through COL2A1, ACAN, COL1A2 expression by western blot analysis. A good chondrogenic differentiation must exhibit COL2A1 and ACAN expression while lacking in COL1A2. The results revealed both COL2A1 and ACAN protein expression in all the chondrospheroids cultured under either normoxia or hypoxia conditions (Figure 33), but, as expected, lack of expression in the control group (Figure S6). As occurred with the previous results, the western blot analysis also confirmed a greater chondrogenic differentiation at 7 days of culture under hypoxia.

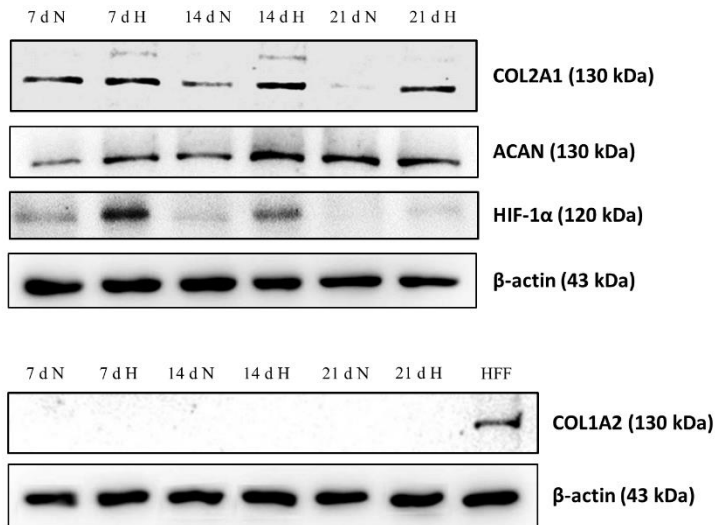
During cartilage development, the alternative splicing of exon 2 in the pre-mRNA of type II procollagen gen (COL2A1 in human) results in two isoforms of type II procollagen. Type IIA isoforms contain exon 2, while type IIB isoform lacks this exon. This event was found to be developmentally-regulated during chondrogenesis, where chondroprogenitor cells express predominantly IIA isoform while differentiated chondrocytes produce mainly IIB (Hering *et al.*, 2014; McAlinden *et al.*, 2014). Our results from the western blot analysis revealed a second band at higher molecular size in the COL2A1 expression only in chondrospheroids cultured under hypoxia conditions at 7 and 14 days. These results suggested two different cell populations with different chondrogenic differentiation level within the spheroid.

In addition to COL2A1 and ACAN, the induced hypoxia transcription factor (HIF1- $\alpha$ ) was also studied. HIF1- $\alpha$  positively regulates both COL2A1 and ACAN expression and is expressed by cells in response to low surrounding oxygen levels (Buravkova *et al.*, 2014). In concordance to this feature, our results revealed a peak in HIF-1 $\alpha$  expression in chondrospheroids at 7 days of culture both in normoxia and hypoxia conditions, being the expression higher under hypoxia. These results correlated with the elevated COL2A1 and ACAN expression at this time and are in line with those obtained by other authors (Shi *et al.*, 2015; Galeano-Garcés *et al.*, 2017). However HIF-1 $\alpha$  was not enough to promote the chondrogenic differentiation in the absence of CIM (Figure S6). In the case of the spheroids cultured in CM (control group), only those

spheroids cultured under hypoxia conditions exhibited HIF1- $\alpha$  at 7 and 14 days of culture (Figure S6).

As mentioned before, in addition to the chondrogenic specific markers, collagen type I (COL1A2), present in skin, bone and fibrocartilage, but not in hyaline cartilage, was also studied. It has been previously reported that the osteogenesis is downregulated at low oxygen levels (Kim *et al.*, 2016). Moreover, hypoxia promotes hASCs chondrogenic differentiation (Wan Safwani *et al.*, 2017) and inhibits endochondral ossification with a reduced expression in Runx2 and collagen type X (COL10A1; Lee *et al.*, 2013). Also of note, Xu *et al.* found that hypoxic preconditioning enhanced their chondrogenic differentiation while decreasing osteogenic differentiation of murine ASCs (Xu *et al.*, 2007). Of relevance, in our western blot analysis the expression of COL1A2 was suppressed in all culture conditions chondrospheroids. In the case of the chondrospheroids cultured under normoxia, the low local oxygen level in the spheroids due to the 3D structure might had inhibited COL1A2 expression. Furthermore, the 3D structure together with the hypoxia culture conditions led to a more reduced local oxygen tension throughout the spheroids (Schon *et al.*, 2012), producing higher levels of chondrogenic differentiation in hypoxia.





**Figure 33:** Analysis of COL2A1, ACAN, HIF-1 $\alpha$  and COL1A2 protein expression by using the western blot method. As an internal control of the COL1A2, human foreskin fibroblasts (HFF) cell line was used. N: normoxia (20% O<sub>2</sub>); H: hypoxia (5% O<sub>2</sub>); d: days.

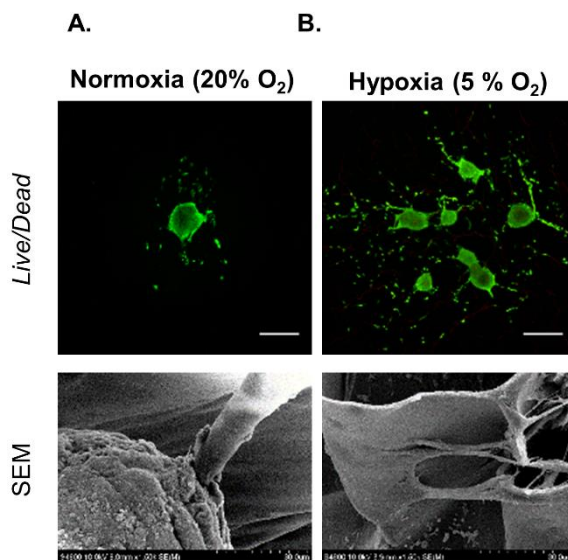
#### IV.4.2.3 hASCs spheroids adhesion, viability and chondrogenic differentiation in the CS/CHNC 3D porous scaffold

Apart from the previously mentioned key requirements like chemical versatility, robust mechanical properties, thermosensitivity, hydrophilicity, controlled biodegradability and biocompatibility (Tibbit *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2017), scaffold's design should also consider the spheroid size, in order to retain them and allow spheroid's cell adhesion and chondral differentiation (Baptista *et al.*, 2018). In addition to this, the ideal scaffold should resemble those molecules present in cartilage ECM, mainly collagen and GAGs.

As we have demonstrated in our previous study, the CS/CHNC material is an excellent 3D porous scaffold presenting an interconnected porous comprising from 250 to 500  $\mu\text{m}$ , that promote high culture medium uptake for efficient transfer of nutrients

and oxygen to cells. Moreover, the biomaterial also provided a suitable substrate for cell adhesion, proliferation and offered specific topological cues for cell guidance (Zubillaga *et al.*, 2018).

In the present study, we first analyzed spheroids adhesion to the CS/CHNC material and viability at 7 days, under normoxia and hypoxia conditions by high-resolution SEM and *Live/Dead* fluorescence-based double staining. At the time of seeding the control group spheroids diameter was  $305 \pm 22 \mu\text{m}$ , size that allows them to penetrate into the pores. SEM images show that CS/CHNC 3D porous scaffolds provided an adequate substrate for hASCs spheroid adhesion. Furthermore, the results from the *Live/Dead* assay revealed that cells were viable, egressed from the spheroid and adhered to the exposed surface of the biomaterial. Interestingly, spheroids cultured under hypoxia conditions exhibited higher proliferation compared to normoxia conditions (Figure 34).



**Figure 34:** Adhesion (SEM) and viability of adhered hASCs spheroids (*Live/Dead* assay) at 7 days in contact with the studied CS/CHNC 3D porous scaffold under (A) normoxia (20% O<sub>2</sub>) and (B) hypoxia (5% O<sub>2</sub>). Scale bar in the fluorescence images represents 500  $\mu\text{m}$  in the fluorescence images.

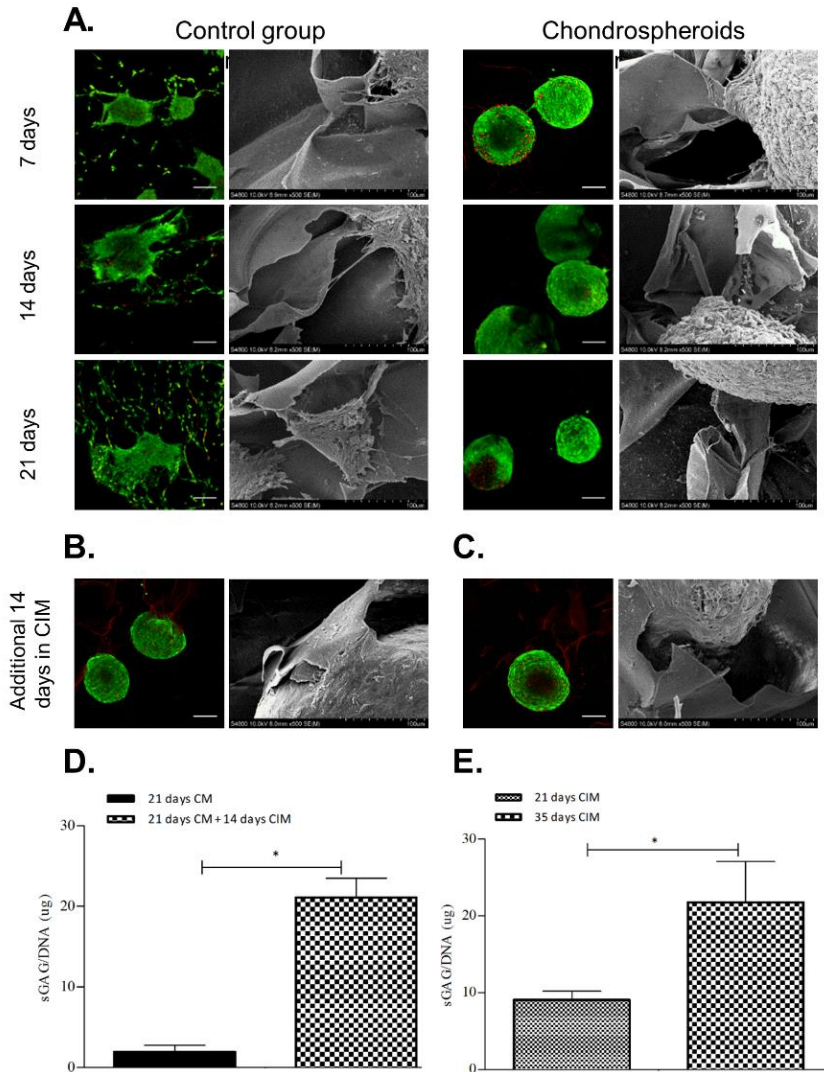
Considering these results, together with the fact that the *in vivo* environment of the hASCs and articular cartilage is hypoxic, further studies were carried out only under low oxygen tension conditions. In these hypoxic microenvironment, the adhesion and viability of the hASCs control spheroids and chondrospheroids were analyzed at long culture times (Figure 35). The *Live/Dead* images demonstrate that cells from the control group egressed from spheroids, proliferated and progressively colonized the exposed surface of the 3D porous scaffold from 7 to 21 days of culture. High magnification SEM images show cells forming cytoplasmic projection and interacting with the surrounding CS/CHNC scaffold. In contrast, chondrospheroids tended to form compact aggregates, comparable to the chondrification centers present during cartilage development, and maintained this physical structure over all the time of the study (Figure 35A and B). These results suggested that the CS/CHNC 3D scaffold was adequate to support hASCs differentiating as chondrification centers.

As mentioned previously, hypoxia has been reported to promote proliferation, chondrogenic differentiation capacity (Pei *et al.*, 2017), cell survival and migration ability post-engraftment (Hu *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2011). Considering these features and, in order to study the effect of hypoxia in our differentiation model, we designed an experimental protocol in which spheroids were exposed to low oxygen tension for 21 days in CM prior to CIM addition. Under these conditions, spheroids lost their structure due to the egression of cells which began to colonize the 3D scaffold. However, when the CIM was added, cells tended again to form compact aggregates with a regular contour that resembled the chondrification centers (Figure 35B).

The ECM of hyaline cartilage consists of a fibrillar collagen network with entrapped sGAG molecules, hence, sGAG had been also considered a chondrogenic differentiation marker. Related to the influence of the chemical composition of the biomaterial in cell differentiation, CH and CS could play a very significant role in cartilage TE due to their structural similarity with the GAGs present in the ECM of cartilage tissue (Noh *et al.*, 2006; Dash *et al.*, 2011). It has been previously described good differentiation capabilities, in terms of cartilage specific gene expression sGAG/COL II

secretion, in hASCs spheroids seeded in PLGA/CS (Zhang *et al.*, 2015) and CS/hyaluronan scaffolds (Huang *et al.*, 2011), showing the importance of the scaffolds topographical cues in promoting ECM production (Popielarczyk *et al.*, 2017).

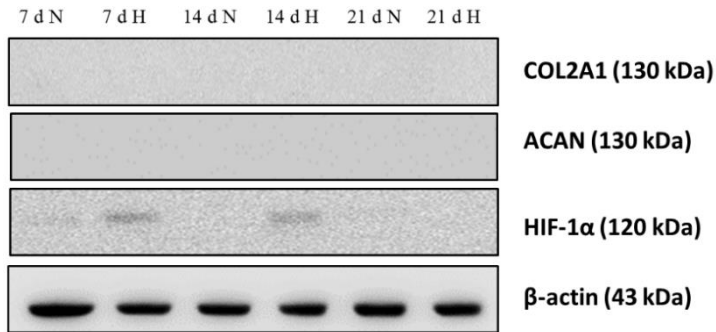
Our results revealed that control group spheroids produced significant lower amount of sGAG than chondrospheroids cultured in CIM for 21 days ( $1.960 \pm 0.80$  and  $9.1 \pm 1.13$   $\mu\text{g sGAG/DNA}$ , respectively). On the other hand, chondrospheroids from both 35 days culture groups (21 days in CM plus additional 14 days in CIM or 35 days in CIM) reached similar chondrogenic differentiation level producing  $21.10 \pm 2.40$  and  $21.77 \pm 7.28$   $\mu\text{g sGAG/DNA}$ , respectively. These results suggested that hypoxia itself was not enough to produce a sufficient amount of sGAG, but allowed to reduce the chondrogenic differentiation time in presence of CIM. This event can be due to the effect of hypoxia as reported by Krinner *et al.*, who found that 5% O<sub>2</sub> preconditioning enhanced chondrogenic potential in ovine MSCs (Krinner *et al.*, 2009). Similarly, other authors reported that low oxygen tension preconditioning enhanced human MSCs chondrogenic differentiation in micromass, gelatin hydrogel culture (Müller *et al.*, 2011) and pellet culture systems (Adesida *et al.*, 2012). Furthermore, some authors have proved the benefits of hypoxia preconditioning, prior *in vivo* transplantation, in order to enhance cell resistance to hypoxic stress (Baldari *et al.*, 2017).



**Figure 35:** Establishment of the cartilage TE construct based on hASCs spheroids adhered to the CS/CHNC 3D porous scaffold in hypoxia conditions. Adhesion (SEM) and viability (Live/Dead assay) of the (A) control group spheroids and chondrospheroids at 7, 14 and 21 days, (B) spheroids cultured at 21 days in CM plus additional 14 days in CIM (C) spheroids cultured for 35 in CIM. Quantification of the ECM deposition, in terms of sGAG/DNA ( $\mu\text{g}$ ), from spheroids cultured (D) 21 days in CM and 21 days in CM plus additional 14 days in CIM and (E) 21 or 35 days in CIM. The scale bar represents  $200\ \mu\text{m}$  in the fluorescence images. Data shown are Mean  $\pm$  SD (\* $p < 0.05$ ; t-test).

### IV.4.3 Supporting information

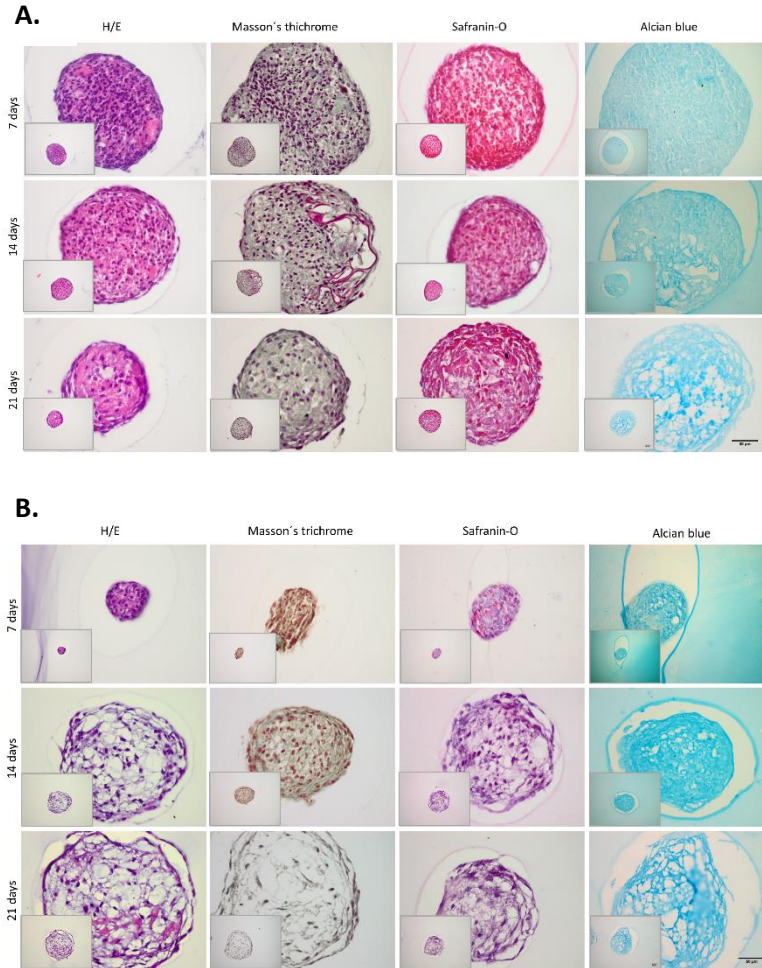
#### S6. Chondrogenic differentiation markers in control group spheroids



**Figure S6:** Analysis of COL2A1, ACAN and HIF-1 $\alpha$  protein expression by using the western blot method in control group spheroids. N: normoxia (20% O<sub>2</sub>); H: hypoxia (5% O<sub>2</sub>); d: days.

Control group spheroids cultured under normoxia and hypoxia conditions were collected at 7, 14 and 21 days for western blot analysis. As expected, none of the samples expressed the cartilage-specific markers COL2A1 and ACAN. Regarding HIF-1 $\alpha$  expression, only spheroids cultured under hypoxia conditions expressed this protein.

### S7. Histological staining in control groups spheroids cultured under normoxia or hypoxia



**Figure S7:** Histological staining of hASCs control group cultured at 7, 14 and 21 days under (A) normoxia (20% O<sub>2</sub>) and (B) hypoxia (5% O<sub>2</sub>) conditions. The scale bar represents 50 μm

Control group spheroids cultured under normoxia (Figure S7.A) and hypoxia (Figure S7.B) conditions were collected at 7, 14 and 21 days for histological staining. As observed, in none of the culture conditions (normoxia or hypoxia) and times studied, hASCs control group spheroids synthesized a specific chondral ECM.









## **V. DISCUSIÓN**



Actualmente, el tratamiento de la OA es fundamentalmente sintomático, dirigiéndose principalmente al alivio del dolor, a la mejora de la movilidad articular y al mantenimiento de la funcionalidad global de la articulación.

En los últimos años las investigaciones dirigidas a la OA han ido en aumento, siendo la IT una opción terapéutica prometedora para la reparación de lesiones traumáticas y degenerativas del cartílago articular (Vinatier y Guicheux, 2016; Walter y cols., 2018), ya que aborda elementos clave de la fisiopatología de esta enfermedad y plantea nuevas estrategias terapéuticas. Esta terapia precisa de un *scaffold* apropiado para su aplicación biomédica, de una fuente celular óptima y de las señales bioquímicas adecuadas para la sustitución del defecto cartilaginoso, su regeneración y la integración del nuevo tejido formado con el nativo.

En el presente trabajo de investigación, tomando como fundamento terapéutico la IT, hemos desarrollado un constructo cartilaginoso *in vitro* constituido por la combinación de hASCs cultivadas en esferoides, adheridos y diferenciados en un biomaterial 3D poroso, compuesto por CS y nanocristales de quitina, bajo condiciones de hipoxia.

Los *scaffolds* utilizados en IT deben ser biocompatibles, permitir la adhesión celular, soportar las cargas a las que el cartílago se ve sometido y ser biodegradables (Puppi y cols., 2010; Zou y cols., 2017). Por último, deben presentar también una estructura porosa para que los nutrientes puedan ser suministrados al tejido en crecimiento (Vunjak-Novakovic, 2003) y para que los esferoides puedan integrarse en ellos (Baptista y cols., 2018).

Los polisacáridos constituyen una buena fuente de materia prima para el desarrollo de múltiples biomateriales con propiedades físicas específicas diferenciadoras, gracias a la versatilidad de las diferentes estructuras químicas que pueden presentar. A este hecho hay que añadir sus múltiples ventajas, como son el reducido impacto ambiental, su procedencia de fuentes renovables, el relativo bajo coste económico y su escasa toxicidad (Barbucci y cols., 2008; Laurienzo y cols., 2015).

En este sentido, los polímeros de origen natural como polisacáridos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y glucoproteínas son modelos poliméricos atractivos para la IT. En particular, la CH es un miembro de la familia de los aminoglucopiranos que se extrae del exoesqueleto de crustáceos, insectos y paredes celulares de los hongos. Además, es un buen material estructural, ya que se presenta de forma natural como una estructura micro y nanofibrilar altamente organizada (Salaberria y *cols.*, 2015).

A nivel molecular, las cadenas largas de CH forman fibrillas que se agrupan formando regiones altamente cristalinas, acompañadas de regiones desordenadas (amorfas). Las fibrillas de CH se pueden romper para dar lugar a dos nanoformas; nanocristales (CHNC) y nanofibras (CHNF). Las propiedades únicas de las nanoformas de CH, entre las que se incluyen su pequeño tamaño, reactividad química, bioactividad y alta biocompatibilidad, las convierten en candidatas únicas para las aplicaciones médicas (Salaberria y *cols.*, 2015; Zubillaga y *cols.*, 2018).

Por otro lado, el CS es el principal derivado de la CH y ha sido ampliamente estudiado debido a su alta biodegradabilidad, propiedades antimicrobianas, biocompatibilidad e hidrofilia (Pangon y *cols.*, 2016; Varoni y *cols.*, 2017; Wu y *cols.*, 2017). Sin embargo, presenta una serie de limitaciones intrínsecas como son unas propiedades mecánicas pobres e hinchamiento incontrolado en contacto con el agua. Para solucionar dichas limitaciones, se incorporaron las nanoformas de CH al CS para mejorar las propiedades finales de los *scaffolds*. Esta adición aumenta la rugosidad superficial de los materiales y mejora sus propiedades mecánicas, siendo ambas necesarias para promover la adhesión y proliferación celular (Nishida y *cols.*, 1983; De Mesquita y *cols.*, 2012; Ifuku y *cols.*, 2013; Foster y *cols.*, 2015; Liu y *cols.*, 2015; Rubentheren y *cols.*, 2015; Sun y *cols.*, 2016; Zubillaga y *cols.*, 2018).

Para estudiar la influencia de la incorporación de las nanoformas de CH, en términos de tasa de degradación, de biocompatibilidad y de adhesión celular, se han diseñado *films* 2D y *scaffolds* 3D porosos formados por CS/CHNF y CS/CHNC, entrecruzados con genipín. Este entrecruzador de origen natural ha demostrado ser

menos citotóxico que otros entrecruzadores utilizados, como el glutaraldehído (Arteche Pujana y cols., 2013), motivo por el cual se utiliza ampliamente para obtener materiales biocompatibles y fuertemente entrecruzados (Varoni y cols., 2017). Además, algunos estudios han mostrado el efecto biológico positivo del genipín en la adhesión, proliferación, morfología y diferenciación celular de preosteoblastos MC3T3-E13 (Hillberg y cols., 2009; Gaudiere y cols., 2014), de fibroblastos obtenidos de la piel de ratas (Hillberg y cols., 2009) y en la regeneración nerviosa *in vivo* (Chen y cols., 2005).

Los *scaffolds* que se emplean en IT deben estar diseñados para degradarse de forma gradual y controlada, de manera que permanezcan el tiempo necesario en el cuerpo para que las células secreten una cantidad de MEC suficiente que las mantenga sin necesidad del material. Además, su degradación debe dar lugar a productos que puedan ser eliminados por vías metabólicas habituales del cuerpo. En este sentido, la degradación del CS da lugar a oligosacáridos, de longitud variable, no tóxicos (Bagheri-Khoulenjani y cols., 2009; VandeVord y cols., 2002), que son o bien excretados, o bien incorporados a rutas metabólicas (Vårum y cols., 1997).

La degradación enzimática del CS está mediada por la lisozima, que está presente en la MEC del cartílago humano (Greenwald y cols., 1972) y en otros fluidos corporales, como las lágrimas y la saliva (Temel y cols., 1991). Además, durante los procesos inflamatorios, los neutrófilos y macrófagos liberan también lisozima, entre otras enzimas (Griffiths y cols., 1996). Los valores de la lisozima en el cartílago humano comprenden entre 0.80-3.03  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (Greenwald y cols., 1972). La degradación mediada por la lisozima ha sido previamente estudiada en varios hidrogeles y *scaffolds* compuestos por CS (Amsden y cols., 2007; Jin y cols., 2009; Hu y cols., 2012; Park y cols., 2013). En nuestro estudio, con el objetivo de reproducir las condiciones fisiológicas (Choi y cols., 2014), se utilizó una concentración de lisozima de 2 mg/mL.

La tasa de degradación del CS está principalmente relacionada con su DDA, pero también con la distribución de los residuos de N-acetilo D-glucosamina y su masa molecular (Aiba, 1992; Tomihata e Ikada, 1997; Zhang y Neau, 2001; Noh y cols., 2006).

Asimismo, dicha tasa puede verse modificada por otros factores, como el tamaño de las cadenas de los polímeros, la adición de distintas moléculas como el polivinil alcohol (Duan y *cols.*, 2007; Pillai y Sharma, 2009) y la estructura de los materiales (Noh y *cols.*, 2006).

En nuestro caso, la incorporación de las nanoformas de CH al material base GCS redujo en gran medida la tasa de degradación de los materiales. Por otro lado, en comparación con los *films* 2D, los materiales 3D porosos tuvieron una mayor tasa de degradación, debido a su mayor área superficial, lo que facilita la difusión de la solución de lisozima a través de los poros del material (Lončarević y *cols.*, 2017).

Además, hay que tener en cuenta que el grado de DDA está inversamente relacionado con la cinética de degradación (Croisier y Jérôme, 2013), ya que la lisozima tiene afinidad por los grupos acetilo (Costa-Pinto y *cols.*, 2014). Así, los materiales con un menor DDA, y, por tanto, mayor concentración de nanoformas de CH (GCS/CHNF2), presentan una cinética de degradación mayor. En el caso de los CHNC, aquellos que presentan una concentración más baja (GCS/CHNC0.5) son los que presentan una tasa de degradación mayor (Mincea y *cols.*, 2012). Esto es debido a un mayor espacio disponible entre los CHNC, lo que hace que la solución de lisozima pueda penetrar con mayor facilidad.

Finalmente, se estudió el efecto de la adhesión de las hASCs a los biomateriales en la tasa de degradación de los mismos. La cinética de degradación fue similar a la de los biomateriales que no contenían células adheridas y, por lo tanto, la pérdida de peso está relacionado únicamente con la estructura del propio material.

Después de estudiar la degradación de los materiales, se planteó el estudio de la biocompatibilidad, tanto de los biomateriales 2D como 3D, utilizando las líneas celulares de fibroblastos murinos L-929 y las hASCs. El análisis de la viabilidad celular, mediante el ensayo colorimétrico del MTT, mostró que ninguno de los biomateriales ensayados redujo la viabilidad de los fibroblastos murinos L-929 tras 24 horas de cultivo, alcanzando valores de viabilidad celular superiores al 70% (límite de aceptación



establecido según la norma ISO 10993-5). Asimismo, se obtuvieron resultados similares de viabilidad celular con las hASCs cultivadas en el medio extractivo de los materiales GCS sin nanoCH (82-100% de viabilidad con respecto al valor del control negativo, en *films* 2D y *scaffolds* 3D, respectivamente). Otros estudios han mostrado unos resultados muy similares con MSCs humanas sembradas en *scaffolds* de CS y alginato (Kumbhar y Pawar, 2016).

La adición de las nanoformas de CH al material base de CS tampoco afectó negativamente a la viabilidad de las hASCs. Así, los *films* 2D GCS/CHNC y GCS/CHNF mostraron valores muy similares con todas las concentraciones de nanoformas de CH. Del mismo modo, en relación a los *scaffolds* 3D, la viabilidad celular fue también superior al 70% con respecto al control negativo con todas las concentraciones de nanoformas de CH utilizadas. Sin embargo, las concentraciones superiores de CH redujeron ligeramente la proliferación celular. Este efecto, descrito también por otros autores, puede deberse a una mayor liberación de los constituyentes de los materiales (incluidas las nanoformas de CH), lo que puede conducir a una disminución de la viabilidad celular (Liu y cols., 2016).

La adhesión celular está regulada por los factores fisicoquímicos de los biomateriales, como la absorción de agua (van Wachem y cols., 1985; Liu y cols., 2016), la rugosidad de la superficie (Faia-Torres y cols., 2014), las propiedades mecánicas (Leong y cols., 2003) y el DDA. De hecho, otros autores han descrito que la adhesión de la línea celular de osteoblastos humanos MG-63 se vio aumentada con el incremento del grado del DDA de los *films* de CS (Amaral y cols., 2007).

En este trabajo, las hASCs adheridas sobre los *films* de GCS comenzaron a formar una monocapa viable en la superficie del material, llegando a cubrirlo en su totalidad a los 7 días de cultivo. Este resultado ha sido también descrito por otros autores en este tipo celular y sobre biomateriales de CS (Gomathysankar y cols., 2016).

Como se ha comentado anteriormente, la adhesión y proliferación celular están estrechamente relacionadas con los factores fisicoquímicos de los materiales. De

hecho, en función de las concentraciones de nanoformas de CH, se produce una serie de adaptaciones morfológicas de las hASCs adheridas en los biomateriales. En concreto, las células presentan una morfología más aplanada cuando se adhieren a los *films* GCS/CHNC0.5 y GCS/CHNF0.5 (materiales con mayor DDA). En este sentido, se han observado adaptaciones morfológicas similares en queratinocitos adheridos sobre superficies de CS con mayor DDA (Walter y *cols.*, 2010). Las bajas concentraciones de CHNC y CHNF, tanto en los *films* 2D como en los *scaffolds* porosos 3D, dan lugar a una menor cantidad de CH y, por tanto, más grupos NH<sub>2</sub> libres disponibles para la adhesión celular. Tal disponibilidad de los grupos amino favorece la adhesión de L-929 y hASCs a los materiales GCS/CHNC0.5 y GCS/CHNF0.5.

La adhesión celular a la superficie de un material, además de por todos los factores fisicoquímicos mencionados anteriormente, está influenciada por la capacidad del mismo para la adsorción de proteínas. Por este motivo, el análisis de esta característica proporciona una información relevante para conocer la potencial aplicación biomédica del material. Así, se ha observado que, por ejemplo, tras una lesión corneal, la FN es sintetizada por queratocitos estromales y por las MSCs durante el proceso de cicatrización de las heridas (Sun y *cols.*, 2016). Por este motivo, algunos estudios han utilizado FN para favorecer la adsorción de proteínas a varios recubrimientos de CS.

Estudios previos indican que los biomateriales que contienen una concentración elevada de grupos NH<sub>2</sub> favorecen, no sólo la adhesión y proliferación de queratocitos corneales de conejo, sino también la adsorción de FN y la expresión del gen de la integrina  $\beta$ 1. Además, en función de las diferentes subunidades  $\alpha$  de esta integrina, variará el receptor para el colágeno tipo I o II. Así, las integrinas  $\alpha$ 1 $\beta$ 1,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 y  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 son los receptores para el colágeno tipo I, mientras que las integrinas  $\alpha$ 1 $\beta$ 1,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 y  $\alpha$ 10 $\beta$ 1 lo son para el colágeno tipo II (Lu y *cols.*, 2010). Otros autores han descrito que la combinación de materiales basados en condroitín sulfato y colágeno tipo II promueve las uniones de las hASCs con la MEC mediante la interacción de la integrina  $\alpha$ 10 $\beta$ 1-Col II (Choi y *cols.*, 2014). Además, los materiales de escala nano, como los

presentados en este estudio, también interactúan con proteínas que controlan la función celular y favorecen la adhesión celular, ya que se promueve la adsorción de proteínas (Kilpadi y *cols.*, 2001; Bostancioglu y *cols.*, 2017).

Por otro lado, también se ha sugerido que la rugosidad de la superficie de los biomateriales facilita la adsorción de FN. Además, se ha señalado que la proliferación celular favorecida por la rigidez en la superficie, se relaciona con un aumento de la expresión de la señalización de la integrina y de las adhesiones focales (Liu y Webster, 2007; Rowlands y *cols.*, 2008; Velzenberger y *cols.*, 2009; Walter y *cols.*, 2010).

En nuestro estudio, para generar el constructo de IT, se eligió el biomaterial poroso GCS/CHNC0.5 debido a su elevada biocompatibilidad, DDA, óptima superficie de adhesión y adecuada tasa de degradación.

Atendiendo al componente celular, se han desarrollado diferentes modelos celulares para la formación de tejido cartilaginoso. Entre ellos, se encuentra el uso de condrocitos autólogos, pero su reducida capacidad de expansión *in vitro* y la tendencia a la pérdida de su fenotipo diferenciado, son algunas de las limitaciones que restringen el uso de estas células (Tran-Khanh y *cols.*, 2005). Las MSCs son una alternativa a los condrocitos autólogos, ya que se pueden obtener fácilmente, expandir *in vitro* de forma rápida y son capaces de diferenciarse hacia condrocitos en presencia de los factores de crecimiento y de transcripción adecuados. Las MSCs, gracias a sus propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y paracrinas, pueden modular la respuesta del sistema inmunitario, disminuir la inflamación y participar en la cicatrización de heridas (Kokai y *cols.*, 2014).

Las MSCs pueden obtenerse de diferentes tejidos, siendo la médula ósea y el tejido adiposo las principales fuentes utilizadas en la terapia (Wang y *cols.*, 2015). Sin embargo, las hASCs presentan varias ventajas con respecto a las MSCs derivadas de la médula ósea, como son una mayor capacidad proliferativa, mayor secreción de factores de crecimiento relacionados con la diferenciación condrogénica (IGF, bFGF y TGF- $\beta$ 1), mayores propiedades antiinflamatorias (Li y *cols.*, 2015; Hao y *cols.*, 2017; ) y mayor

estabilidad en la conservación del estado diferenciado (Izadpanah y cols., 2006; Strioga y cols., 2012). Además, se puede obtener un gran número de células de pacientes con procedimientos mínimamente invasivos (Frese y cols., 2016).

Con el objetivo de determinar el modelo celular más adecuado para el diseño del constructo, inicialmente utilizamos un modelo 2D (cultivo en monocapa) previamente establecido y utilizado por otros autores (Winter y cols., 2003). Durante más de un siglo, los cultivos en monocapa han sido utilizados como modelos *in vitro* para el estudio de las respuestas celulares a diferentes estímulos de señales, tanto biofísicas como bioquímicas. Estos cultivos han sido de gran utilidad para entender el comportamiento celular. Sin embargo, la creciente evidencia científica muestra que, en algunas circunstancias, los resultados obtenidos de los sistemas de cultivo en monocapa pueden diferir de la respuesta *in vivo* (Duval y cols., 2017).

Nuestros resultados de la diferenciación condrogénica en monocapa muestran una tendencia espontánea a la agregación por parte de las hASCs (morfología de tipo esferoide). Resultados similares a los de este trabajo han sido descritos previamente en hASCs cultivadas en monocapa y con medios de cultivo similares (Peran y cols., 2013).

Durante el desarrollo embrionario existe una organización espacial controlada de las MSCs, con la formación de centros de condricificación (Marga y cols., 2007). Con el objetivo de reproducir, en la medida de lo posible, las condiciones *in vivo*, y teniendo en cuenta las limitaciones que supone el cultivo en monocapa, las hASCs se cultivaron en estructuras 3D formadas por agregados celulares. Existen diferentes técnicas para la formación de estos agregados, entre las que se incluyen el cultivo en *pellet* (formación de esferoides mediante fuerzas mecánicas) y la técnica *hanging-drop* (formación de esferoides mediante la acción de la gravedad) (Martínez y cols., 2008; Ruedel y cols., 2013; Sridharan y cols., 2018).

En este trabajo, se utilizaron inicialmente ambas técnicas para conocer cuál de ellas resultaba más eficaz para obtener una diferenciación condrogénica óptima de las hASCs. Los resultados de las tinciones histológicas con tricrómico de Masson mostraron

que con ambas se obtenía un nivel de diferenciación similar. Estos resultados coinciden con lo descrito por otros autores, si bien señalan que la diferenciación condrogénica es más lenta en el caso del cultivo en *pellet* que en caso del *hanging-drop* (Ruedel y cols., 2013).

En nuestro estudio, la elección entre ambas técnicas estuvo determinada por el tamaño final de los esferoides obtenido, de forma que pudieran atravesar los poros del biomaterial 3D y distribuirse de un modo homogéneo por la globalidad del mismo. Así, los esferoides formados por el cultivo en *pellet* tenían un diámetro superior al de los poros del biomaterial. Sin embargo, el tamaño máximo que alcanzaron los esferoides formados por *hanging-drop* fue menor que el tamaño de los poros del biomaterial, de manera que podían penetrar y colonizar adecuadamente dicho material.

Una vez elegida la técnica de *hanging-drop* para la formación de los esferoides, se determinó el número idóneo de células sembradas inicialmente para su formación, para lo que se compararon las concentraciones de  $10^4$  y  $15 \times 10^3$  células por esferoide, las cuales se sitúan dentro del rango utilizado por otros autores (Murphy y cols., 2014). Los resultados obtenidos de las tinciones histológicas, en términos de deposición de MEC, demostraron una mayor diferenciación condrogénica en los esferoides compuestos por  $15 \times 10^3$  células, concentración que se mantuvo para el resto de la experimentación.

Un factor importante a considerar para la diferenciación condrogénica de los esferoides hASCs es la tensión de  $O_2$  a la que deben estar sometidos. En este sentido, es preciso tener en consideración que, debido a la ausencia de vasos sanguíneos, el cartílago articular presenta un gradiente de  $O_2$  del 6-10% en su superficie, decreciendo hasta el 1% en las capas más profundas del mismo. Esto indica que el microambiente fisiológico hipóxico es necesario para el mantenimiento y la homeostasis del cartílago articular (Shi y cols., 2015). En el mismo sentido, el microambiente de las hASCs *in vivo* se caracteriza también por una baja presión de  $O_2$ . Por otro lado, se ha sugerido que la

hipoxia reduce el potencial para la diferenciación osteogénica de las hASCs (Wan Safwani y *cols.*, 2017), mientras que promueve la formación de la matriz extracelular condral (Choi y *cols.*, 2017). De hecho, los marcadores de condrocitos como SOX9, colágeno tipo II (COL2A1) y agreganos (ACAN) están positivamente regulados por las condiciones de hipoxia (Jurgens y *cols.*, 2012).

Teniendo en cuenta estos motivos, y con el objetivo de conseguir una diferenciación condrogénica en las condiciones microambientales más idóneas posibles, los esferoides se cultivaron en condiciones de hipoxia, reproduciendo así, de una manera más fiel, las condiciones *in vivo*. Una vez formados, se procedió, en primer lugar, a evaluar la viabilidad celular y el volumen de estos esferoides, comparando los resultados con aquellos obtenidos de los esferoides cultivados en normoxia, para analizar las diferencias debidas al factor O<sub>2</sub>.

Los estudios de viabilidad realizados mediante la técnica de *Live/Dead* mostraron células viables en la superficie de los esferoides obtenidos en ambas condiciones de tensión de O<sub>2</sub>, si bien a los 14 días de cultivo se observó una mayor viabilidad celular en aquellos mantenidos en condiciones de hipoxia. Este resultado concuerda con los descritos por otros autores, según los cuales las condiciones de hipoxia *in vitro* reducen el número de células apoptóticas (Hu y *cols.*, 2011) y mejoran el crecimiento y la supervivencia de las hASCs (Tibbitt y Anseth, 2009; Popielarczyk y *cols.*, 2017; Zou y *cols.*, 2017).

El volumen de un esferoide es resultado de la proliferación celular, de la deposición de MEC y del espacio intercelular (Martínez y *cols.*, 2008). La evaluación de este parámetro cuantitativo mostró una clara tendencia a la disminución del volumen dependiente del tiempo, tanto en esferoides del grupo control como en condroesferoides, resultados que están en línea con los descritos por otros autores. Esta disminución del tamaño parece corresponder a una intensa compactación del esferoide debida a las interacciones célula-célula y a las fuerzas de retracción que se producen entre las células y las fibrillas de la MEC (Hoyer y *cols.*, 2014).

En segundo lugar, se llevó a cabo la evaluación del nivel de diferenciación de los condrosferoides mediante tinciones histológicas, inmunodetección y western blot. Los resultados obtenidos de las preparaciones histológicas mostraron una distribución diferenciada por regiones de los componentes de la MEC en el interior de los condrosferoides. Así, observamos un patrón de distribución de los sGAG en la periferia, mientras que el colágeno se concentraba en la zona central de los condrosferoides. Una distribución muy similar a ésta ha sido previamente descrita en otras publicaciones (Markway *et cols.*, 2010; Schon *et cols.*, 2012; Goude *et cols.*, 2014). Así mismo, algunos autores han señalado la existencia de microambientes y geometrías específicas dentro de los esferoides, que comprenden regiones proliferativas, inactivas y necróticas, lo cual puede ser debido a diferentes tasas de transporte masivo de nutrientes, O<sub>2</sub>, ATP, residuos, CO<sub>2</sub> y lactasa en el esferoide (Cui *et cols.*, 2017), y que de alguna manera podría influir en los patrones de distribución señalados anteriormente.

Una buena diferenciación condrogénica debe presentar expresión de las proteínas condrogénicas COL2A1 y ACAN, mientras que la expresión de COL1A2 debe estar inhibida. Nuestros resultados muestran una buena expresión de ambos marcadores condrogénicos COL2A1 y ACAN, si bien de nuevo hay un mayor nivel de expresión en los esferoides cultivados en condiciones de hipoxia.

Durante el desarrollo embrionario del cartílago, el *splicing* alternativo del exón 2 en el pre-mARN del gen del procolágeno tipo II (COL2A1 en humanos) da lugar a dos isoformas del procolágeno tipo II. Así, las células condroprogenitoras expresan predominantemente isoformas IIA (contienen el exón 2), mientras los condrocitos diferenciados producen principalmente IIB (carecen del exón 2; Hering *et cols.*, 2014; McAlinden, 2014). Nuestros resultados del análisis del western blot revelaron una segunda banda en la expresión del COL2A1, presente sólo en aquellos condrosferoides cultivados en hipoxia. Estos resultados sugieren que hay dos poblaciones celulares con diferente nivel de diferenciación condrogénica dentro del esferoide.

En tercer lugar, evaluamos la expresión de HIF-1 $\alpha$ . Las razones para llevar a cabo dicha evaluación de esta proteína fue doble: por un lado, su expresión se produce como respuesta a los niveles bajos de oxígeno (Buravkova y *cols.*, 2014) y, por otro lado, HIF-1 $\alpha$  regula positivamente la expresión de COL2A1 y ACAN. Nuestros resultados revelan un pico en la expresión de HIF 1- $\alpha$  a los 7 días de cultivo, tanto en normoxia como en hipoxia, siendo mayor en hipoxia. Este pico en la expresión de HIF 1- $\alpha$  se correlaciona con la elevada expresión de COL2A1 y de ACAN a este mismo tiempo. Otros autores han descrito resultados similares en esferoides de hASCs cultivados con 2% O<sub>2</sub>, donde la expresión de los marcadores condrogénicos estaban positivamente regulados a bajos niveles de oxígeno (Shi y *cols.*, 2015; Galeano-Garces y *cols.*, 2017). En el caso de los esferoides del grupo control, solo aquellos cultivados en hipoxia expresaron HIF 1- $\alpha$ .

En cuarto lugar, como se ha mencionado anteriormente, además de los marcadores de la diferenciación condrogénica se evaluó la expresión del COL1A2. El colágeno I está habitualmente presente en la piel, en el hueso y en el fibrocartílago, pero se encuentra prácticamente ausente en el cartílago hialino. Diversos autores han observado que el cultivo celular con un 5% de O<sub>2</sub> promueve la diferenciación condrogénica de las MSCs (Krinner y *cols.*, 2009; Bae y *cols.*, 2018). Asimismo, se ha descrito que los bajos niveles de O<sub>2</sub> inhiben la expresión de COL1A2 (Duval y *cols.*, 2016), la osteogénesis (Kim y *cols.*, 2016) y promueven la diferenciación condrogénica (Wan Safwani y *cols.*, 2017; Bae y *cols.*, 2018), mientras que inhiben la osificación endocondral mediante la reducción de la expresión de Runx2 y COL10A1 (Lee y *cols.*, 2013). En nuestros resultados del western blot, la expresión de COL1A2 estaba suprimida, tanto en los condroesferoides cultivados en normoxia como en hipoxia. En el caso de los condroesferoides cultivados en normoxia, la propia estructura 3D propicia la existencia de una baja concentración de O<sub>2</sub> en el esferoide, razón por la cual puede verse inhibida la expresión de dicha proteína (Schon y *cols.*, 2012). En el caso de los esferoides cultivados en hipoxia, esta razón resulta aún más evidente por la combinación de ambos factores, estructura 3D y baja tensión de O<sub>2</sub>, produciéndose en



consecuencia una mayor expresión de HIF-1 $\alpha$  y, por tanto, una mayor diferenciación condrogénica en hipoxia.

Una vez estudiado el nivel de diferenciación condrogénica de los esferoides, se procedió a la siembra y diferenciación de los mismos en el propio material 3D poroso CS/CHNC. De forma preliminar, estudiamos la adhesión y viabilidad celular de los esferoides del grupo control adheridos al biomaterial en condiciones de normoxia y de hipoxia durante 7 días de cultivo. Los resultados mostraron que el material proporciona una resistencia mecánica y unas señales topológicas que mantienen la adhesión y proliferación celular, siendo ambas mayores en condiciones de hipoxia.

Considerando el hecho de que el microambiente *in vivo* de las hASCs y del cartílago es hipóxico, como ya se ha indicado previamente, que la baja tensión de O<sub>2</sub> promueve la supervivencia, migración (Hu y cols., 2008; Hu y cols., 2011; Baldari y cols., 2017), proliferación celular y la capacidad de diferenciación condrogénica, así como todos nuestros resultados previos, se eligió la hipoxia como uno de los criterios fundamentales para generar el constructo cartilaginoso de IT.

En relación con la influencia de la composición química del *scaffold* utilizado en la propia diferenciación condrogénica, se ha destacado la importancia de las señales topológicas de los *scaffolds* en la producción de MEC (Popielarczyk y cols., 2017; Zahiri y cols., 2018). Algunos autores han observado una buena diferenciación condrogénica, en términos de expresión de COL2A1 y sGAG, en esferoides de hASCs sembrados sobre PLGA/CS (Zhang y cols., 2015) y CS/ácido hialurónico (Huang y cols., 2011).

Como se ha comentado anteriormente, la MEC del cartílago hialino está compuesta por una red fibrilar de colágeno donde las moléculas de sGAG se encuentran inmersas. Así, el nivel de expresión de sGAG es considerado un buen marcador de diferenciación condrogénica. En este sentido, es preciso señalar que los componentes del *scaffold* utilizado en nuestro estudio, la CH y el CS, desempeñan un papel importante en la IT del cartílago, debido a su similitud estructural con la de los sGAG presentes en la MEC del tejido cartilaginoso (Noh y cols., 2006; Dash y cols., 2011).

En nuestro estudio analizamos el nivel de producción de sGAG durante el proceso de diferenciación de los esferoides adheridos al material CS/CHNC. Con el objetivo de determinar, de un modo más específico, el efecto de la hipoxia en dicho proceso de diferenciación, diseñamos un experimento en el que comparamos la producción de sGAG dentro del material en las siguientes dos condiciones: *i*, esferoides cultivados durante 21 días en CM más 14 días adicionales en CIM y, *ii*, esferoides cultivados durante los 35 días en CIM. Nuestros resultados muestran que los condroesferoides cultivados en ambas condiciones dieron lugar a un alto nivel de producción de sGAG, sin que existiera diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, a los 21 días el nivel de sGAGs obtenido de los esferoides cultivados en CM fue significativamente inferior que el producido por los esferoides cultivados en CIM. Esto sugiere que la hipoxia, por sí misma, no es suficiente para producir una buena cantidad de sGAG, pero sí permite reducir el tiempo de la diferenciación condrogénica en presencia de CIM.

Otros autores han observado que las bajas tensiones de oxígeno promueven la diferenciación condrogénica de MSCs en cultivo en micromasa (Adesida y cols., 2012), en hidrogeles de gelatina (Müller y cols., 2011) y en esponjas de colágeno tipo I/III (Gómez-Leduc y cols., 2017). Más aún, hay estudios actuales que analizan los beneficios del acondicionamiento con hipoxia del constructo tisular, previo a su trasplante *in vivo*, para promover la resistencia celular al estrés inducido por la hipoxia.

En resumen, el constructo de IT obtenido en nuestro estudio, combina la utilización de esferoides de hASCs (de fácil disponibilidad y alta capacidad de diferenciación), adheridas a un material de origen natural, respetuoso con el medio ambiente, cuyos componentes (CS/CHNC, con similitud estructural con los sGAG presentes en el cartílago) permiten su adhesión y diferenciación condrogénica, la cual es promovida a su vez por las condiciones de cultivo en hipoxia. Este constructo de IT supone una propuesta terapéutica novedosa dirigida a la regeneración del cartílago en el abordaje terapéutico de la OA.



## **VI. CONCLUSIONS**

1. The Genipin-crosslinked bionanocomposites (GCS/CH nanoforms) 2D films and 3D porous scaffolds displayed better swelling properties, enhanced the Young's modulus, compression strength, chemical and mechanical versatility, cell compatibility, bioactivity and an optimal enzymatic degradation rate when compared to nanoform-free GCS materials.
2. GCS and GCS/CH nanoforms 2D films and 3D porous scaffolds were biocompatible *in vitro*, as demonstrated by L-929 and hASCs cell lines viability and adhesion studies.
3. The addition of CH nanoforms to the GCS base material improved cell adhesion, especially at low CH nanoforms ratios. Comparing GCS/CHNC and GCS/CHNF 2D films and 3D porous scaffolds, GCS/CHNC biomaterials provide a more suitable substrate for cell adhesion and proliferation.
4. The *hanging-drop* technique allows the formation of compact hASCs spheroids and present an adequate size to introduce them in the 3D porous scaffolds. Furthermore, hASCs spheroids exhibited a high chondrogenic differentiation in terms of COL2A1 and ACAN deposition, while limiting COL1A2 matrix deposition.
5. The low O<sub>2</sub> conditions during the chondrogenic differentiation promoted an increased expression of the chondrogenic markers (COL2A1 and ACAN), which is associated to an increase in HIF-1 $\alpha$  expression.
6. hASCs spheroids cultured in the CS/CHNC 3D porous scaffold in presence of chondrogenic induction media and low oxygen conditions, resulted in a chondral ECM production with important sGAG synthesis.

7. The combination of all elements used in this chondrogenic differentiation model give rise to a tissue engineering construct susceptible to be used in cartilage regeneration.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**





- Ab-Rahim S, Selvaratnam L, Raghavendran HR, Kamarul T. Chondrocyte-alginate constructs with or without TGF- $\beta$ 1 produces superior extracellular matrix expression than monolayer cultures. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2013; 376 (1-2):11–20.
- Adesida AB, Mulet-Sierra A, Jomha NM. Hypoxia mediated isolation and expansion enhances the chondrogenic capacity of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy* 2012; 3(2):9.
- Adler N, Schoeniger A, Fuhrmann H. Effects of transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-1 $\beta$  on inflammatory markers of osteoarthritis in cultured canine chondrocytes. *American Journal of Veterinary Research* 2017; 78(11):1264–1272.
- Aewsiri T, Benjakul S, Visessanguan W, Wierenga PA, Gruppen H. Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin–tannic acid complex as influenced by types of interaction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2010; 11(4):712–720.
- Ahmed M, Ramos TADS, Damanik F, Quang Le B, Wieringa P, Bennink M, Van Blitterswijk C, De Boer J, Moroni L. A combinatorial approach towards the design of nanofibrous scaffolds for chondrogenesis. *Scientific Reports* 2015; 5:14804.
- Aiba Sei-ichi. Studies on chitosan: Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules* 1992; 14(4):225–228.
- Aisenbrey EA, Bryant SJ. Mechanical loading inhibits hypertrophy in chondrogenically differentiated hMSCs within a biomimetic hydrogel. *Journal of Materials Chemistry B* 2016; 4(20):3562–3574.
- Akeda K, An HS, Okuma M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar EJ, Lenz ME, Sah RL, Masuda K. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006; 14(12):1272–1280.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin FJ, Schedi A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & Development* 2002; 16(21):2813–2828.
- Akman YE, Sukur E, Senel A, Oztas Sukur NE, Talu CK, Ozturkmen Y. The comparison of the effects of a novel hydrogel compound and traditional hyaluronate following microfracture procedure in a rat full-thickness chondral defect model. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica* 2017; 51(4):331–336.
- Al-Qarni A, Lewington MR, Wong IH. Reconstruction of focal femoral head cartilage defects with a chitin-based scaffold. *Arthroscopy Techniques* 2016; 14;5(2):e257–e262.

Amaral IF, Cordeiro AL, Sampaio P, Barbosa MA. Attachment, spreading and short-term proliferation of human osteoblastic cells cultured on chitosan films with different degrees of acetylation. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition* 2012; 18(4):469–485.

Amarilio R, Viukov SV., Sharir A, Eshkar-Oren I, Johnson RS, Zelzer E. HIF1 regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development* 2007; 134(21):3917–3928.

Amsden BG, Sukarto A, Knight DK, Shapka SN. Methacrylated glycol chitosan as a photopolymerizable biomaterial. *Biomacromolecules* 2007; 8:3758–3766.

Anitua E, Sánchez M, Orive G, Padilla S. A biological therapy to osteoarthritis treatment using platelet-rich plasma. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2013; 13(8):1161–1172.

Armiento AR, Stoddart MJ, Alini M, Eglin D. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. *Acta Biomaterialia* 2018; 65:1–20.

Arteche Pujana M, Pérez-Álvarez L, Cesteros Iturbe LC, Katime I. Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers* 2013; 94(2):836–842.

Azeredo HMC, Waldron KW. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact - a review. *Trends in Food Science & Technology* 2016; 52:109–122.

Azevedo, H. S. & Reis, R. L. Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate. En: Reis R, San Roman J, editors. *Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine*. Boca Ratón Florida: CRC Press; 2004.

Bae HC, Park HJ, Wang SY, Yang HR, Lee MC, Han HS. Hypoxic condition enhances chondrogenesis in synovium-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials Research* 2018; 22:28.

Bagheri-Khoulenjani S, Taghizadeh SM, Mirzadeh H. An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. *Carbohydrate Polymers* 2009; 78(4):773–778.

Baldari S, Di Rocco G, Piccoli M, Pozzobon M, Muraca, M, Toietta, G. Challenges and strategies for improving the regenerative effects of mesenchymal stromal cell-based therapies. *International Journal of Molecular Science* 2017; 18(10):e2087.

Baptista LS, Kronemberger GS, Cortes I, Charelli LE, Matsui RAM, Palhares TN, Sohier J, Rossi AM, Granjeiro JM. Adult stem cells spheroids to optimize cell colonization in

scaffolds for cartilage and bone tissue engineering. *International Journal of Molecular Science* 2018; 19(5):e1285.

Baraniak PR, Mcdevitt TC. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. *Cell Tissue Research* 2012; 347(3):701–711.

Barbucci R, Pasqui D, Favalaro R, Panariello G. A thixotropic hydrogel from chemically cross-linked guar gum: synthesis, characterization and rheological behaviour. *Carbohydrate Research* 2008; 343(18):3058–3065.

Bark S, Piontek T, Behrens P, Mkalaluh S, Varoga D, Gille J. Enhanced microfracture techniques in cartilage knee surgery: Fact or fiction? *World Journal of Orthopaedics* 2014; 5(4):444-449.

Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2010; 107(31):13724–13729.

Bell DM, Leung KKH, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nature Genetics* 1997; 16(2):174–178.

Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage* 2013; 21(1):16–21.

Bernardo V, Gisela M, Alves ML, Mano FJ. Cell behaviour in new poly ( L-lactic acid ) films with crystallinity gradients. *Materials letter* 2012; 87:105–108.

Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin* 2008; 87:77–95.

Bi Y, Ehrichiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, Li L, Leet AI, Seo BM, Zhang L, Shi S, Young MF. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nature Medicine* 2007; 13(10):1219–1227.

Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World Journal of Stem Cells* 2010; 2(4):81-92.

Bobic V. Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions. *Orthopade* 1999; 28(1):19-25.

Bostancioglu RB, Gurbuz M, Akyurekli AG, Dogan A, Koparal AS, Koparal AT. Adhesion profile and differentiation capacity of human adipose tissue derived mesenchymal stem

cells grown on metal ion (Zn, Ag and Cu) doped hydroxyapatite nano-coated surfaces. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 2017; 155:415–428.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of Deep Cartilage Defects in The Knee Autologous Chondrocytes Transplantation. *The New England Journal of Medicine* 1994; 331(14):889–895.

Broom ND, Poole CA. A functional-morphological study of the tidemark region of articular cartilage maintained in a non-viable physiological condition. *Journal of Anatomy* 1982; 135 (Pt 1):65–82.

Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea FM, Argüelles-Monal W, Desbrières J, Rianudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 2001; 42(8):3569–3580.

Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clinical Orthopaedics and related research* 2002; 402:21-37.

Buravkova LB, Andreeva ER, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? *Mitochondrion* 2014; 19 Pt A:105–112.

Butler MF, Ng Y-F, Pudney PD A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2003; 41(24):3941–3953.

Calabrese G, Forte S, Gulino R, Cefali F, Figallo E, Salvatorelli L, Maniscalchi ET, Angelico G, Parenti R, Gulisano M. Combination of collagen-based scaffold and bioactive factors induces adipose-derived mesenchymal stem cells chondrogenic differentiation *in vitro*. *Frontiers in Physiology* 2017; 8:50.

Camarero-Espinosa S, Rothen-Rutishauser B, Foster EJ, Weder C. Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomaterials Science* 2016; 4(5):734–767.

Cardoso L, Fritton SP, Gailani G, Benalla M, Cowin SC. Advances in assessment of bone porosity, permeability and interstitial fluid flow. *Journal of Biomechanics* 2013; 46(2):253–265.

Castro-Viñuelas R, Sanjurjo-Rodríguez C, Piñeiro-Ramil M, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete IM, de Toro-Santos FJ, Blanco-García FJ, Díaz-Prado SM. Induced pluripotent stem cells for cartilage repair: current status and future perspectives. *European Cells and Materials* 2018; 36:96–109.

Centers for Disease and Control Prevention. Prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2010; 59(39):1261–1265.

Chahal J, Gross AE, Gross C, Mall N, Dwyer T, Chahal A, Whelan DB, Cole BJ. Outcomes of osteochondral allograft transplantation in the knee. *Arthroscopy* 2013; 29(3):575–588.

Chen Y, Chang J, Cheng C, Tsai F, Yao C, Liu B. An *in vivo* evaluation of a biodegradable genipin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material. *Biomaterials* 2005; 26(18):3911–3918.

Cheng A, Genever PG. SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. *Journal of Bone and Mineral Research* 2010; 25(12):2680–2689.

Cheng A, Hardingham TE, Kimber SJ. Generating cartilage repair from pluripotent stem cells. *Tissue Engineering Part B: Review* 2014; 20(4):257–266.

Cheng NC, Chen SY, Li JR, Young TH. Short-term spheroid formation enhances the regenerative capacity of adipose-derived stem cells by promoting stemness, angiogenesis, and chemotaxis. *Stem Cells Translational Medicine* 2013; 2(8):584–594.

Cheng YJ, Hootman JM, Murphy LB, Langmaid CG, Helmick MD. Prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitations. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2010; 59(39):1261–1265.

Chia SL, Sawaji Y, Burleigh A, McLean C, Inglis J, Saklatvala J, Vincent T. Fibroblast growth factor 2 is an intrinsic chondroprotective agent that suppresses ADAMTS-5 and delays cartilage degradation in murine osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2009; 60(7):2019–2027.

Chintala SK, Miller RR, McDevitt CA. FGF2 binds matrix in growth plate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1994; 310(1):180-186.

Choi B, Kim S, Fan J, Kowalski T, Petrigliano F, Evseenko D, Lee M. Covalently conjugated transforming growth factor- $\beta$ 1 in modular chitosan hydrogels for the effective treatment of articular cartilage defects. *Biomaterials Science* 2015; 3(5):742–752.

Choi B, Kim S, Lin B, Wu BM, Lee M. Cartilaginous extracellular matrix-modified chitosan hydrogels for cartilage tissue engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2014; 6(22):20110–20121.

Choi JR, Pingguan-Murphy B, Wan Abas WA, Yong KW, Poon CT, Noor Azmi MA, Omar SZ, Chua KH, Xu F, Wan Safwani WK. *In situ* normoxia enhances survival and proliferation rate of human adipose tissue-derived stromal cells without increasing the risk of tumourigenesis. *PLoS One* 2015; 10(1):e0115034.

Choi JR, Pingguan-Murphy B, Wan Abas WAB, Noor Azmi MA, Omar SZ, Chua KH, Wan Safwani WK. Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and

differentiation potential of human adipose-derived stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014; 448(2):218–224.

Choi JR, Pingguan-Murphy B, Wan Abas WAB, Noor Azmi MA, Omar SZ, Chua KH, Wan Safwani WKZ. Hypoxia promotes growth and viability of human adipose-derived stem cells with increased growth factors. *Asian Journal of Scientific Research* 2014; 448(2), 218–224.

Choi JR, Yong KW, Wan Safwani WKZ. Effect of hypoxia on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its potential clinical applications. *Cellular and Molecular Life Science* 2017; 74(14):2587–2600.

Choi S, Kim JH, Ha J, Jeong BI, Jung YC, Lee GS, Woo HM, Kang BJ. Intra-articular injection of alginate-microencapsulated adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis in rabbits. *Stem Cells International* 2018; 2791632.

Chong PP, Selvaratnam L, Abbas AA, Kamarul T. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 2012; 30(4):634–642.

Chu, C. editor. Biodegradable Polymeric Biomaterials: An Updated Overview. The Biomedical Engineering Handbook 2000.

Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, Ruszymah BHI. Insulin-Transferrin-Selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage. *European Cells and Materials* 2005; 9: 58–67.

Citro L, Naidu S, Hassan F, Kuppusamy ML, Kuppusamy P, Angelos MG, Khan M. Comparison of human induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes with human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction. *PLoS One* 2014; 9(12):e116281.

Cohen AB, Chenoweth DE, Hugli TE. The release of elastase, myeloperoxidase, and lysozyme from human alveolar macrophages. *The American Review of Respiratory Disease* 1982; 126(2):241–247.

Cohen JA, Imrey PB, Planchon SM, Bermel RA, Fisher E, Fox RJ, Bar-Or A, Sharp SL, Skaramagas TT, Jagodnik P, Karafa M, Morrison S, Reese Koc J, Gerson SL, Lazarus HM. Pilot trial of intravenous autologous culture-expanded mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 2018; 24(4):501–511.

Conaghan PG. Parallel evolution of OA phenotypes and therapies. *Nature Reviews Rheumatology* 2013; 9(2):68–70.

Costa-Pinto AR, Martins AM, Castelhana-Carlos MJ, Correlo VM, Sol PC, Longatto-Filho A, Battacharya M, Reis RL, Neves NM. *In vitro* degradation and *in vivo* biocompatibility of chitosan-poly(butylene succinate) fiber mesh scaffolds. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 2014; 29(2):137–151.

Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* 2013; 49(4):780–792.

Crowder SW, Leonardo V, Whittaker T, Papathanasiou P, Stevens MM. Material cues as potent regulators of epigenetics and stem cell function. *Cell Stem Cell* 2016; 18(1):39–52.

Cugat R, Cuscó X, Seijas R, Álvarez P, Steinbacher G, Ares O, Wang-Saegusa A, García-Balletbó M. Biologic enhancement of cartilage repair: The role of platelet-rich plasma and other commercially available growth factors. *Arthroscopy* 2015; 31(4):777–783.

Cui W, Wang Q, Chen G, Zhou S, Chang Q, Zuo Q, Ren K, Fan W. Repair of articular cartilage defects with tissue-engineered osteochondral composites in pigs. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2011; 111(4):493–500.

Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of the Royal Society Interface* 2017; 14(127):20160877.

Danišovič Ľ, Varga I, Polák Š. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue and Cell* 2012; 44(2):69–73.

Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *Journal of Orthopaedic Research* 2005; 23(2):425–432.

Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan - a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 2011; 36(8):981–1014.

De Dicastillo CL, Rodríguez F, Guarda A, Galotto MJ. Antioxidant films based on cross-linked methyl cellulose and native Chilean berry for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers* 2016; 136:1052–1060.

De Kroon LM, Narcisi R, van den Akker GG, Vitters EL, Blaney Davidson EN, van Osch GJ, van der Kraan PM. SMAD3 and SMAD4 have a more dominant role than SMAD2 in TGFβ-induced chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Scientific Reports* 2017; 7:43164.

De Mesquita JP, Donnici CL, Teixeira IF, Pereira F V. Bio-based nanocomposites obtained through covalent linkage between chitosan and cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers* 2012; 90(1):210–217.

Deepthi S, Jayakumar R. Prolonged release of TGF- $\beta$  from polyelectrolyte nanoparticle loaded macroporous chitin-poly (caprolactone) scaffold for chondrogenesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016; 93(Pt B):1402–1409.

Derfoul A, Perkins GL, Hall DJ, Tuan RS. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells* 2006; 24(6):1487–1495.

Díaz-Prado SM, Fuentes-Boquete I, Blanco FJ. Cell therapy and tisular engineering to regenerate articular cartilate. En: Olsztynska S, editor. Biomedical Engineering. Trends, Research and Technology. InTech; 2011.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315–317.

Duan B, Wu L, Li X, Yuan X, Li X, Zhang Y, Yao K. Degradation of electrospun PLGA-chitosan/PVA membranes and their cytocompatibility *in vitro*. *Journal of Biomaterial Science, Polymer Edition* 2007; 18(1):95–115.

Dubey NK, Mishra VK, Dubey R, Syed-Abdul S, Wang JR, Wang PD, Deng WP. Combating osteoarthritis through stem cell therapies by rejuvenating cartilage: A review. *Stem Cells International* 2018; 2018:5421019.

Duval E, Baugé C, Andriamanalijaona R, Bénateau H, Leclercq S, Dutoit S, Poulain L, Galéra P, Boumédiene K. Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in *in vivo* cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2012; 33(26):6042–6051.

Duval E, Bouyoucef M, Leclercq S, Baugé C, Boumédiene K. Hypoxia inducible factor 1 alpha down-regulates type I collagen through Sp3 transcription factor in human chondrocytes. *IUBMB Life* 2016; 68(9):756–763.

Duval E, Leclercq S, Elissalde JM, Demoor M, Galéra P, Boumédiene K. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: Hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1 lpha-dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis & Rheumatology* 2009; 60(10):3038–3048.

Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* 2017; 32(4):266–277.



Dy P, Wang W, Bhattaram P, Wang Q, Wang L, Ballock RT, Lefebvre V. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Developmental Cell* 2012; 22(3):597–609.

Echtermeyer F, Bertrand J, Dreier R, Meinecke I, Neugebauer K, Fuerst M, Lee YJ, Song YW, Herzog C, Theilmeier G, Pap T. Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nature Medicine* 2009; 15(9):1072–1076.

Ergelet C, Vavken P. Microfracture for the treatment of cartilage defects in the knee joint – A golden standard? *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma* 2016; 7(3):145–152.

Eyre DR, Wu JJ. Collagen structure and cartilage matrix integrity. *Journal Rheumatology Supplement* 1995; 43:82-85.

Eyre DR. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research and Therapy* 2002; 4(1):30–35.

Faia-Torres AB, Guimond-Lischer S, Rottmar M, Charnley M, Goren T, Maniura-Weber K, Spencer ND, Reis RL, Textor M, Neves NM. Differential regulation of osteogenic differentiation of stem cells on surface roughness gradients. *Biomaterials* 2014; 35(33):9023–9032.

Fan Y, Fukuzumi H, Saito T, Isogai A. Comparative characterization of aqueous dispersions and cast films of different chitin nanowhiskers/nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules* 2012; 50(1):69–76.

Felson DT. Osteoarthritis : New Insights. *Annals of Internal Medicine* 2000; 133(8):637–639.

Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, De Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology* 2013; 31(2):108–115.

Finn G. Histología. 3ª ed. Madrid: Editorial Panamericana; 2002.

Flannery CR, Hughes CE, Schumacher BL, Tudor D, Aydelotte MB, Kuettner KE, Caterson B. Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 254(3):535–541.

Foster LJR, Ho S, Hook J, Basuki M, Marçal H. Chitosan as a biomaterial: Influence of degree of deacetylation on its physiochemical, material and biological properties. *PLoS One* 2015; 10(8):e0135153.

Fotia C, Massa A, Boriani F, Baldini N, Granchi D. Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology* 2015; 67(6):1073–1084.

Foty R. A Simple *hanging drop* cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *Journal of Visualized Experiments* 2011; 51:e2720.

Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2016; 43(4):268–274.

Friedstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology* 1976; 4(5):267-274.

Frith JE, Thomson B, Genever PG. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Engineering Part C: Methods* 2010; 16(4):735-749.

Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 2004; 22(5):649–658.

Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, Tajima Y, Asahara H. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(9):8343–8350.

Futrega K, Palmer JS, Kinney M, Lott WB, Ungrin MD, Zandstra PW, Doran MR. The microwell-mesh: A novel device and protocol for the high throughput manufacturing of cartilage microtissues. *Biomaterials* 2015; 62:1–12.

Galeano-Garces C, Camilleri ET, Riester SM, Dudakovic A, Larson DR, Qu W, Smith J, Dietz AB, Im HJ, Krych AJ, Larson AN, Karperien M, van Wijnen AJ. Molecular validation of chondrogenic differentiation and hypoxia responsiveness of platelet-lysate expanded adipose tissue-derived human mesenchymal stromal cells. *Cartilage* 2017; 8(3):283–299.

Gálvez P, Clares B, Hmadcha A, Ruiz A, Soria B. Development of a cell-based medicina product: regulatory structures in the Eupean Union. *British Medical Bulletin* 2014; 105:85-105.

Gálvez P, Ruiz A, Clares B. El futuro de la medicina clínica hacia nuevas terapias: terapia celular, génica y nanomedicina. *Medicina Clínica* 2011; 137(14):645–649.

Gao L, McBeath R, Chen CS. Stem cell shape regulates a chondrogenic *versus* myogenic fate through rac1 and N-cadherin. *Stem Cells* 2010; 28(3):564–572.

- Gaudiere F, Morin-Grognon S, Bidault L, Lembre P, Pauthe E, Vannier J, Atmani H, Ladam G, Labat B. Genipin-cross-linked layer-by-layer assemblies: biocompatible microenvironments to direct bone cell fate. *Biomacromolecules* 2014; 15(5):1602-1611.
- Gartner LP, Hiatt JL. Cartílago y hueso. En: *Histología básica*. Barcelona: Elsevier; 2015.
- Gionet-Gonzales MA, Leach JK. Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. *Biomedical Materials* 2018; 13(3):34109.
- Goldring SR, Goldring MB. Clinical aspects, pathology and pathophysiology of osteoarthritis. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* 2006; 6(4):376–378.
- Gomathysankar S, Halim AS, Yaacob NS, Noor NM, Mohamed M. Compatibility of porous chitosan scaffold with the attachment and proliferation of human adipose-derived stem cells *in vitro*. *Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine* 2016; 12(2):79–86.
- Gómez-Leduc T, Desancé M, Hervieu M, Legendre F, Ollitrault D, de Vienne C, Herlicoviez M, Galéra P, Demoor M. Hypoxia is a critical parameter for chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in type I/III collagen sponges. *International Journal of Molecular Science* 2017; 18(9):1–23.
- Gomoll AH, Probst C, Farr J, Cole BJ, Minas T. Use of a type I/III bilayer collagen membrane decreases reoperation rates for symptomatic hypertrophy after autologous chondrocyte implantation. *The American Journal of Sports Medicine* 2009; 37 Suppl 1:20S–23S.
- Goodrich JD, Winter WT. Alpha-chitin nanocrystals prepared from shrimp shells and their specific surface area measurement. *Biomacromolecules* 2007; 8(1):252–257.
- Gopalan Nair K, Dufresne A. Crab shell chitin whisker reinforced natural rubber nanocomposites. 1. Processing and swelling behavior. *Biomacromolecules* 2003; 4(3):657–665.
- Goude MC, McDevitt TC, Temenoff JS. Chondroitin sulfate microparticles modulate transforming growth factor- $\beta$ 1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cell spheroids. *Cells Tissues Organs* 2014; 199(2–3):117–130.
- Goyal D, Goyal A, Keyhani S, Lee EH, Hui JH. Evidence-based status of second- and third-generation autologous chondrocyte implantation over first generation: A systematic review of level I and II studies. *Arthroscopy* 2013; 29(11):1872–1878.

Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *Journal of Orthopaedic Research* 1989; 7(2):208–218.

Greenwald RA, Josephson AS, Diamond HS, Tsang A. Human cartilage lysozyme. *The Journal of Clinical Investigation* 1972; 51(9):2264–2270.

Griffiths MM, Langone JJ, Lightfoote MM. Biomaterials and granulomas. *Methods* 1996; 9(2):295–304.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 97(25):13625–13630.

Gross AE, Silverstein EA, Falk J, Falk R, Langer F. The allotransplantation of partial joints in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1975; 108:7-14.

Guadix JA, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular. *Medicina Clínica* 2017; 148(9):408–414.

Gucciardo L, Lories R, Ochsenbein-Kölbl N, Zwijsen A, Deprest J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2009; 116(2):166–172.

Haaparanta AM, Järvinen E, Cengiz IF, Ellä V, Kokkonen HT, Kiviranta I, Kellomäki M. Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2014; 25(4):1129–1136.

Hao T, Chen J, Zhi S, Zhang Q, Chen G, Yu F. Comparison of bone marrow- vs adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for attenuating liver fibrosis. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2017; 14(6):5956–5964.

Hering TM, Wirthlin L, Ravindran S, McAlinden A. Changes in type II procollagen isoform expression during chondrogenesis by disruption of an alternative 5' splice site within col2a1 exon 2. *Matrix Biology* 2014; 36:51–63.

Hewitson KS, Liénard BM, McDonough MA, Clifton IJ, Butler D, Soares AS, Oldham NJ, McNeill LA, Schofield CJ. Structural and mechanistic studies on the inhibition of the hypoxia-inducible transcription factor hydroxylases by tricarboxylic acid cycle intermediates. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(5):3293–3301.

Hildebrandt C, Büth H, Thielecke H. Tissue and Cell A scaffold-free *in vitro* model for osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* 2011; 43(2):91–100.

Hillberg AL, Holmes CA, Tabrizian M. Effect of genipin cross-linking on the cellular adhesion properties of layer-by-layer assembled polyelectrolyte films. *Biomaterials* 2009; 30(27):4463–4470.

Hingert D, Barreto Henriksson H, Brisby H. Human mesenchymal stem cells pre-treated with IL-1 $\beta$  and stimulated with BMP-3 enhance chondrogenesis. *Tissue Engineering Part A* 2017; 24(9-10):775–785.

Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, Mabuchi A, Sapkota BR, Akune T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Tokunaga K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. C/EBP $\beta$  and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 $\alpha$  as the inducer in chondrocytes. *Human Molecular Genetics* 2012; 21(5):1111–1123.

Hoyer M, Meier C, Breier A, Hahner J, Heinrich G, Drechsel N, Meyer M, Rentsch C, Garbe LA, Ertel W, Lohan A, Schulze-Tanzil G. *In vitro* characterization of self-assembled anterior cruciate ligament cell spheroids for ligament tissue engineering. *Histochemistry Cell Biology* 2014; 143(3):289–300.

Hu J, Feng K, Liu X, Peter M. Chondrogenic and osteogenic differentiations of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a nanofibrous scaffold with designed pore network. *Biomaterials* 2009; 30(28):5061–5067.

Hu J, Hou Y, Park H, Choi B, Hou S, Chung A, Lee M. Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2012; 8(5):1730–1738.

Hu X, Wei L, Taylor TM, Wei J, Zhou X, Wang J, Yu SP. Hypoxic preconditioning enhances bone marrow mesenchymal stem cell migration via kv2.1 channel and FAK activation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2011; 301(2):362–372.

Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang JA, Wei L. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2008; 135(4):799–808.

Huang BJ, Hu JC, Athanasiou KA. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials* 2016; 98:1-22.

Huang GS, Dai LG, Yen BL, Hsu SH. Spheroid formation of mesenchymal stem cells on chitosan and chitosan-hyaluronan membranes. *Biomaterials* 2011; 32(29):6929–6945.

Huang Z, He G, Huang Y. Deferoxamine synergizes with transforming growth factor- $\beta$  signaling in chondrogenesis. *Genetics and Molecular Biology* 2017; 40(3):698–702.

Hui AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 2012; 4(1):15–37.

Hung KC, Tseng CS, Hsu SH. Synthesis and 3D printing of biodegradable polyurethane elastomer by a water-based process for cartilage tissue engineering applications. *Advanced Healthcare Materials* 2014; 3(10):1578–1587.

Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *British Medical Journal* 2006; 332(7542):639–42.

Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, de Munter W, Grevers LC, Jeanson J, Noël D, Casteilla L, Jorgensen C, Van Den Berg W, Van Lent PL. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2012; 64(11):3604–3613.

Ichinose S, Tagami M, Muneta T, Sekiya I. Morphological examination during *in vitro* cartilage formation by human mesenchymal stem cells. *Cell and Tissue Research* 2005; 322(2):217–226.

Ifuku S, Ikuta A, Egusa M, Kaminaka H, Izawa H, Morimoto M, Saimoto H. Preparation of high-strength transparent chitosan film reinforced with surface-deacetylated chitin nanofibers. *Carbohydrate Polymers* 2013; 98(1):1198–1202.

Ifuku S, Nogi M, Abe K, Yoshioka M, Morimoto M, Saimoto H, Yano H. Preparation of chitin nanofibers with a uniform width as alpha-chitin from crab shells. *Biomacromolecules* 2009; 10(6):1584–1588.

Ikeda Y, Sakaue M, Chijimatsu R, Hart DA, Otsubo H, Shimomura K, Madry H, Suzuki T, Yoshikawa H, Yamashita T, Nakamura N. IGF-1 gene transfer to human synovial mscs promotes their chondrogenic differentiation potential without induction of the hypertrophic phenotype. *Stem Cells International* 2017; 5804147.

Islam A, Hansen AK, Mennan C, Zubiaurre-Martinez I. Mesenchymal stromal cells from human umbilical cord stromal cells display poor chondrogenic potential in scaffold-free three dimensional cultures: A comparative study. *European Cells & Materials* 2016; 31:407–424.

Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006; 99(5):1285–1297.

- Jennings JA. Controlling chitosan degradation properties *in vitro* and *in vivo*. En: Jennings JA, Bumgargner JD, editors. Chitosan Based Biomaterials. 1ª edición. San Diego:Elsevier; 2016. Páginas 159-182
- Jin R, Moreira Teixeira LS, Dijkstra PJ, Karperien M, van Blitterswijk CA, Zhong ZY, Feijen J. Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2009; 30(13):2544–2551.
- Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, Dodge G, Eglin D, Guilak F, Madry H, Mata A, Mauck R, Semino C, Stoddart M. Tissue engineering for articular cartilage repair—the state of the art. *European Cells & Materials* 2013; 25:248–267.
- Jost V, Kobsik K, Schmid M, Noller K. Influence of plasticiser on the barrier, mechanical and grease resistance properties of alginate cast films. *Carbohydrate Polymers* 2014; 110: 309–319.
- Jurgens WJFM, Lu Z, Zandieh-Doulabi B, Kuik DJ, Ritt MJPF, Helder MN. Hyperosmolarity and hypoxia induce chondrogenesis of adipose-derived stem cells in a collagen type 2 hydrogel. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2012; 6(7):570–578.
- Kabiri M, Kul B, Lott WB, Futrega K, Ghanavi P, Upton Z, Doran MR. Biochemical and biophysical research communications 3d mesenchymal stem / stromal cell osteogenesis and autocrine signalling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 419(2):142–147.
- Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, Taketani S, Kusumoto K. Hypoxia enhances proliferation of human adipose-derived stem cells via HIF-1 $\alpha$  activation. *PLoS One* 2015; 10(10):e0139890.
- Karlsson JO, Ostwald K, Kåbjörn C, Andersson M. A method for protein assay in Laemmli buffer. *Analytical Biochemistry* 1994; 219(1):144–146.
- Kasaai MR, Kasaai MR. Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57(5):1667–1676.
- Kasir R, Vernekar VN, Laurencin CT. Regenerative Engineering of Cartilage Using Adipose-Derived Stem Cells. *Regenerative Engineering and Translational Medicine* 2015; 1(1):42–49.
- Kawadkar J, Chauhan MK. Intra-articular delivery of genipin cross-linked chitosan microspheres of flurbiprofen: preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012; 81(3):563–572.

Kawakami Y, Tsuda M, Takahashi S, Taniguchi N, Esteban CR, Zemmyo M, Furumatsu T, Lotz M, Izpisua Belmonte JC, Asahara H. Transcriptional coactivator PGC-1alpha regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102(7):2414–2419.

Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010; 62(1):3–11.

Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Research* 2002; 12(1):19–32.

Kierszenbaum AL, Tres LL. Tejido conjuntivo. En: *Histología y Biología Celular. Introducción a la anatomía patológica*. 3a ed. Barcelona: Elsevier; 2016. Páginas 128-132.

Kilpadi KL, Chang P, Bellis SL. Hydroxylapatite binds more serum proteins , purified integrins , and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *Journal of Biomedical Materials and Research Part A* 2001; 57(2):258-267.

Kim HA, Cho ML, Choi HY, Yoon CS, Jhun JY, Oh HJ, Kim HY. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis & Rheumatology* 2006; 54(7):2152–2163.

Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC, Cho CS. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 2008; 26(1):1–21.

Kim JH, Yoon SM, Song SU, Park SG, Kim WS, Park IG, Lee J, Sung JH. Hypoxia suppresses spontaneous mineralization and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via IGFBP3 up-regulation. *International Journal of Molecular Science* 2016; 17(9):e1389.

Kim UJ, Park J, Kim HJ, Wada M, Kaplan DL. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* 2005; 26(15):2775–2785.

Kim YS, Choi YJ, Suh DS, Heo DB. Mesenchymal Stem Cell Implantation in Osteoarthritic Knees Is Fibrin Glue Effective as a Scaffold ? *The American Journal of Sports Medicine* 2014; 43(1):176–185.

Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S, Grodzinsky AJ. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair. *Proceedings of the National Academy of Science* 2002; 99(15):9996–10001.

Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu S-J, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 2006; 444(7118):481-485.



Klimczak A, Kozłowska U. Mesenchymal stromal cells and tissue-specific progenitor cells: their role in tissue homeostasis. *Stem Cells International* 2015; 2016:4285215.

Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Cell and Developmental Biology* 2001; 12(2):69–78.

Kokai LE, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells: Biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Translational Research* 2014; 163(4):399–408.

Krinner A, Zscharnack M, Bader A, Drasdo D, Galle J. Impact of oxygen environment on mesenchymal stem cell expansion and chondrogenic differentiation. *Cell Proliferation* 2009; 42(4):471–484.

Kuise T, Noguchi H, Tazawa H, Kawai T, Iwamuro M, Saitoh I, Kataoka HU, Watanabe M, Noguchi Y, Fujiwara T. Establishment of a pancreatic stem cell line from fibroblast-derived induced pluripotent stem cells. *Biomedical Engineering Online* 2014; 13:64.

Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* 2000; 46:1–27.

Kumbhar SG, Pawar SH. Synthesis and characterization of chitosan-alginate scaffolds for seeding human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. *Biomedical Materials and Engineering* 2016; 27(6):561–575.

Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: *In vitro* differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2007; 103(5):389–398.

Kwon H, Paschos NK, Hu JC, Athanasiou K. Articular cartilage tissue engineering: the role of signaling molecules. *Cellular and Molecular Life Science* 2016; 73(6):1173–1194.

Laschke MW, Menger MD. Life is 3D: Boosting spheroid function for tissue engineering. *Trends in Biotechnology* 2017; 35(2):133–144.

Lee HH, Chang CC, Shieh MJ, Wang JP, Chen YT, Young TH, Hung SC. Hypoxia enhances chondrogenesis and prevents terminal differentiation through Pi3k/Akt/FoxO dependent anti-apoptotic effect. *Scientific Reports* 2013; 3:2683.

Lee JS, Im G II. SOX trio decrease in the articular cartilage with the advancement of osteoarthritis. *Connective Tissue Research* 2011; 52(6):496–502.

Legendre F, Ollitrault D, Hervieu M, Baugé C, Maneix L, Goux D, Chajra H, Mallein-Gerin F, Boumediene K, Galera P, Demoor M. Enhanced hyaline cartilage matrix synthesis in collagen sponge scaffolds by using siRNA to stabilize chondrocytes phenotype cultured with BMP-2 under hypoxia. *Tissue Engineering Part C: Methods* 2013; 19(7):550–567.

Leight JL, Liu WF, Chaturvedi RR, Chen S, Yang MT, Raghavan S, Chen CS. Manipulation of 3D cluster size and geometry by release from 2d micropatterns. *Cellular and Molecular Bioengineering* 2012; 5(3):299–306.

Leong KF, Cheah CM, Chua CK. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* 2003; 24(13):2363–2378.

Li C, Wu X, Tong J, Yang X, Zhao J, Zheng Q, Zhao G, Ma Z. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy* 2015; 6:55.

Li J, Zhao Z, Liu J, Huang N, Long D, Wang J, Li X, Liu Y. MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF- $\beta$ 1/Smads pathway. *Cell Proliferation* 2010; 43(4):333–343.

Li X, Ding J, Zhuang X, Chang F, Wang J, Chen X. Chitosan-Based Scaffolds for Cartilage Regeneration. En: Dutta PK, editor. Chitin and chitosan for Regenerative Medicine. Dehradun, India: Series editor; 2016. Páginas 61-82.

Liang Y, Idrees E, Szojka A, Andrews S, Kunze M, Mulet-Sierra A, Jomha N, Adesida AB. Chondrogenic differentiation of synovial fluid mesenchymal stem cells on human meniscus-derived decellularized matrix requires exogenous growth factors. *Acta Biomaterialia* 2018; 80:131-143.

Liao J, Hu N, Zhou N, Lin L, Zhao C, Yi S, Fan T, Bao W, Liang X, Chen H, Xu W, Chen C, Cheng Q, Zeng Y, Si W, Yang Z, Huang W. Sox9 potentiates BMP2-induced chondrogenic differentiation and inhibits BMP2-induced osteogenic differentiation. *PLoS One* 2014; 9(2):e89025.

Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal* 2008; 3(9-10):1172–1184.

Liu H, Liu W, Luo B, Wen W, Liu M, Wang X, Zhou C. Electrospun composite nanofiber membrane of poly(L-lactide) and surface grafted chitin whiskers: Fabrication, mechanical properties and cytocompatibility. *Carbohydrate Polymers* 2016; 147:216–225.

Liu H, Webster TJ. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials* 2007; 28(2):354–369.

Liu M, Peng Q, Luo B, Zhou C. The improvement of mechanical performance and water-response of carboxylated SBR by chitin nanocrystals. *European Polymer Journal* 2015; 68:190–206.

Liu M, Zheng H, Chen J, Li S, Huang J, Zhou C. Chitosan-chitin nanocrystal composite scaffolds for tissue engineering. *Carbohydrate Polymer* 2016; 152:832–840.

Liu X, Liu J, Kang N, Yan L, Wang Q, Fu X, Zhang Y, Xiao R, Cao Y. Role of insulin-transferrin-selenium in auricular chondrocyte proliferation and engineered cartilage formation *in vitro*. *International Journal of Molecular Science* 2014; 15(1):1525–1537.

Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocrine Reviews* 2009; 30(3):204–213.

Loeser FR, Goldring SR, Scanzello C, Goldring MB. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis & Rheumatology* 2012; 64(6):1697–1707.

Lončarević A, Ivanković M, Rogina A. Lysozyme-induced degradation of chitosan: the characterisation of degraded chitosan scaffolds. *Journal of Tissue Repair and Regeneration* 2017; 1(1):12–22.

Longobardi L, O’Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A, Horton WA, Moses HL, Spagnoli A. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *Journal of Bone Mineral Research* 2006; 21(4):626–636.

Loza E, Lopez-Gomez JM, Abasolo L, Maese J, Carmona L, Batlle-Gualda E. Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain. *Arthritis & Rheumatology* 2009; 61(2):158–165.

Lu Z, Doulabi BZ, Huang C, Bank R a, Helder MN. Collagen type II enhances chondrogenesis in adipose tissue-derived stem cells by affecting cell shape. *Tissue Engineering Part A* 2010; 16(1):81–90.

Majd S, Yuan Y, Mishra S, Haggard WO, Bumgardner JD. Effects of material property and heat treatment on nanomechanical properties of chitosan films. *Journal of Biomedical Matererials Research Part B: Applied Biomaterials* 2009; 90(1):283–289.

Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. Stem cells: insights into the secretome. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1834(11):2380–2384.

Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nature Reviews Rheumatology* 2016; 11(1):21–34.

Marappagounder D, Somasundaram I, Dorairaj S, Sankaran R. Differentiation of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and subcutaneous adipose tissue into pancreatic islet-like clusters *in vitro*. *Cellular and Molecular Biology Letters* 2013; 18(1):75-88.

Marga F, Neagu A, Kosztin I, Forgacs G. Developmental biology and tissue engineering. *Birth Defects Research: Part C - Embryo Today Reviews* 2007; 81(4):320–328.

Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplantation* 2010, 19(1):29–42.

Martínez I, Elvenes J, Olsen R, Bertheussen K, Johansen O. Redifferentiation of *in vitro* expanded adult articular chondrocytes by combining the hanging-drop cultivation method with hypoxic environment. *Cell Transplantation* 2008; 17(8):987–996.

Mathew AP, Laborie MPG, Oksman K. Cross-linked chitosan/chitin crystal nanocomposites with improved permeation selectivity and pH stability. *Biomacromolecules* 2009; 10(6):1627–1632.

McAlinden, A. Alternative splicing of type ii procollagen: IIB or not IIB? *Connective Tissue Research* 2014; 55(3):165–176.

McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental Cell* 2004; 6(4):483–495.

McMillen P, Holley SA. Integration of cell-cell and cell-ECM adhesion in vertebrate morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 2016; 36:48-53.

Medvedeva E, Grebenik E, Gornostaeva S, Telpuhov V, Lychagin A, Timashev P, Chagin A. Repair of Damaged Articular Cartilage: Current Approaches and Future Directions. *International Journal of Molecular Science* 2018; 19(8):e2366.

Mellado-López M, Griffeth RJ, Meseguer-Ripolles J, Cugat R, García M, Moreno-Manzano V. Plasma rich in growth factors induces cell proliferation, migration, differentiation, and cell survival of adipose-derived stem cells. *Stem Cells International* 2017; 5946527.

Mhanna R, Kashyap A, Palazzolo G, Vallmajo-Martin Q, Becher J, Möller S, Schnabelrauch M, Zenobi-Wong M. Chondrocyte culture in three dimensional alginate sulfate hydrogels promotes proliferation while maintaining expression of chondrogenic markers. *Tissue Engineering Part A* 2014; 20(9-10):1454–1464.

Mi FL, Shyu SS, Peng CK. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2005; 43(10):1985–2000.

Mi FL, Sung HW, Shyu SS. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2000; 38(15):2804–2814.

Miljkovic ND, Cooper GM, Marra KG. Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008; 16(10):1121–1130.

Mincea M, Negrulescu A, Ostafe V. Preparation, modification, and applications of chitin nanowhiskers: a review. *Review on Advanced Material Science* 2012; 30:225–242.

Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006; 24(2):376–385.

Mitra T, Sailakshmi G, Gnanamani A, Mandal AB. Studies on cross-linking of succinic acid with chitosan/collagen. *Materials Research* 2013; 16(4):755–765.

Miyagawa Y, Okita H, Hiroyama M, Sakamoto R, Kobayashi M, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J-I, Umezawa A, Kiyokawa N. A microfabricated scaffold induces the spheroid formation of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and promotes efficient adipogenic differentiation. *Tissue Engineering: Part A* 2011; 17(3-4):513–521.

Molendijk I, Barnhoorn MC, de Jonge-Mullet ES, Mieremet-Ooms MA, van der Reijden JJ, van der Helm D, Hommes DW, van der Meulen-de Jong AE, Verspaget H. Intraluminal Injection of mesenchymal stromal cells in spheroids attenuates experimental colitis. *Journal of Crohn's and Colitis* 2016; 10(8):953-964.

Mollon B, Kandel R, Chahal J, Theodoropoulos J. The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. *Osteoarthritis and Cartilage* 2013; 21(12):1824–1833.

Morales A. Identificación de patrones de viabilidad y expresión génica en condrocitos articulares humanos para su utilización en ingeniería tisular. [Tesis Doctoral]. Granada: Universidad de Granada, Facultad de Medicina; 2010.

Mueller MB, Blunk T, Appel B, Maschke A, Goepferich A, Zellner J, Englert C, Prantl L, Kujat R, Nerlich M, Angele P. Insulin is essential for in vitro chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells and influences chondrogenesis in a dose-dependent manner. *International Orthopaedics* 2013; 37(1):153–158

Mujtaba M, Salaberria AM, Andres MA, Kaya M, Gunyakti A, Labidi J. Utilization of flax (*Linum usitatissimum*) cellulose nanocrystals as reinforcing material for chitosan films. *International Journal of Biological Macromolecules* 2017; 104(Pt A):944–952.

Müller J, Benz K, Ahlers M, Gaissmaier C, Mollenhauer J. Hypoxic conditions during expansion culture prime human mesenchymal stromal precursor cells for chondrogenic differentiation in three-dimensional cultures. *Cell Transplantation* 2011; 20(10):1589–1602.

Müller JM, Santos RL dos, Brigido RV. Produção de alginato por microrganismos. *Polimeros Ciencia e Tecnologia* 2011; 21(4):305–310.

Murakami S, Kan M, McKeenan WL, de Crombrughe B. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *The American Journal of Sports Medicine* 2000; 97(3):1113–1118.

Murata D, Tokunaga S, Tamura T, Kawaguchi H, Miyoshi N, Fujiki M, Nakayama K, Misumi K. A preliminary study of osteochondral regeneration using a scaffold-free three-dimensional construct of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2015; 10:35.

Murphy KC, Fang SY, Leach LK. Human mesenchymal stem cell spheroids in fibrin hydrogels exhibit improved cell survival and potential for bone healing. *Cell and Tissue Research* 2014; 357(1):91–99.

Muzzarelli RAA. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers* 2009; 77(1):1–9.

Nakagawa Y, Muneta T, Otabe K, Ozeki N, Mizuno M, Udo M, Saito R, Yanagisawa K, Ichinose S, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Cartilage derived from bone marrow mesenchymal stem cells expresses lubricin *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 2016; 11(2):e0148777.

Nakamura K, Shirai T, Morishita S, Uchida S, Saeki-Miura K, Makishima F. p38 Mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. *Experimental Cell Research* 1999; 250(2):351–363.

Nazempour A, Quisenberry CR, Abu-Lail NI, Wie BJ Van. Enhancing adipose stem cell chondrogenesis: A study on the roles of dexamethasone, transforming growth factor  $\beta$ 3 and ascorbate supplements and their combination. *Journal of Stem Cell Therapy and Transplantation* 2017; 1:28–51.

Nazempour A, Van Wie BJ. Chondrocytes, mesenchymal stem cells, and their combination in articular cartilage regenerative medicine. *Annals of Biomedical Engineering* 2016; 44(5):1325–1354.

Nesic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006; 58(2):300–322.

Ng KW, Ateshian GA, Hung CT. Zonal chondrocytes seeded in a layered agarose hydrogel create engineered cartilage with depth-dependent cellular and mechanical inhomogeneity. *Tissue Engineering Part A* 2009; 15(9):2315–2324.

Nielsen JS, McNagny KM. CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery. *Microcirculation* 2009; 16(6):487–496.

Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Ohashi Y, Watanabe K, Manabe R. Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. *Journal of Cell Biology* 1983; 97(5 Pt 1):1653–1657.

Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Wakabayashi M, Yoneda T. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *The Journal of Biochemistry* 2012; 151(3):247–254.

Noh HK, Lee SW, Kim JM, Oh JE, Kim KH, Chung CP, Choi SC, Park WH, Min BM. Electrospinning of chitin nanofibers: degradation behavior and cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts. *Biomaterials* 2006; 27(21):3934–3944.

Nordtveit RJ, Vårum KM, Smidsrød O. Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme. *Carbohydrate Polymers* 1996; 29(2):163–167.

Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *Journal of Orthopaedic Research* 2002; 20(5):1060–1069.

Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis* 2011; 105 Suppl 1:S13–33.

Oliveira JM, Pina S, Reis RL, San Román J. Synthetic materials for osteochondral tissue engineering. En: Oliveira JM, Pina S, Reis RL, San Román J, editores. Osteochondral tissue engineering: nanotechnology, scaffolding-related developments and translation. Suiza: Springer 2018. Página 49.

Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2001; 2(3):reviews3005.1–3005.12.

Ouasti S, Donno R, Cellesi F, Sherratt MJ, Terenghi G, Tirelli N. Network connectivity, mechanical properties and cell adhesion for hyaluronic acid/PEG hydrogels. *Biomaterials* 2011; 32(27):6456–6470.

Panetti TS, Hannah DF, Avraamides C, Gaughan JP, Marcinkiewicz C, Huttenlocher A, Mosher DF. Extracellular matrix molecules regulate endothelial cell migration stimulated by lysophosphatidic acid. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2004; 2(9):1645–1656.

Pangon A, Saesoo S, Saengkrit N, Ruktanonchai U, Intasanta V. Hydroxyapatite-hybridized chitosan/chitin whisker bionanocomposite fibers for bone tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers* 2016; 144:419–427.

Pap T, Korb-Pap A. Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis -Two unequal siblings. *Nature Reviews Rheumatology* 2015; 11(10):606–615.

Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* 2010; 3(3):1863-1887.

Park H, Choi B, Hu J, Lee M. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2013; 9(1):4779–4786.

Park JB y Lakes RS. Polymeric implants materials. En: Park JB, Lakes RS, editores. *Biomaterials an introduction*. New York: Springer; 2007. Pág 173-2005.

Park, JB y Lakes, R. S. *Biomaterials An Introduction*. New York: Springer; 2007. Páginas 485-515.

Pei M. Environmental preconditioning rejuvenates adult stem cells' proliferation and chondrogenic potential. *Biomaterials* 2017; 117:10–23.

Peran M, Ruiz S, Kwiatkowski W, Marchal JA, Yang SL, Aranega A, Choe S, Izpisua Belmonte JC. Activin/BMP2 chimeric ligands direct adipose-derived stem cells to chondrogenic differentiation. *Stem Cell Research* 2013; 10(3):464-476.

Pereira D, Ramos E, Branco J. Osteoarthritis. *Acta Medica Portuguesa* 2015; 28(1):99–106.

Petrenko Y, Syková E, Kubinová Š. The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Research Therapy* 2017; 8(1):94.

Pillai CKS, Sharma CP. Electrospinning of Chitin and Chitosan Nanofibres. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs* 2009; 22(3):179-201.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1987; 284(5411):143-147.



Pizzute T, Li J, Zhang Y, Davis ME, Pei M. Fibroblast growth factor ligand dependent proliferation and chondrogenic differentiation of synovium-derived stem cells and concomitant adaptation of Wnt/mitogen-activated protein kinase signals. *Tissue Engineering Part A* 2016; 22(15-16):1036–1046.

Pogue R, Lyons K. BMP signaling in the Cartilage Growth Plate. *Current Topics in Developmental Biology* 2006; 76:1-48.

Popielarczyk T, Nain A, Barrett J. Aligned nanofiber topography directs the tenogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Applied Science* 2017; 7(1):59.

Porstmann B, Jung K, Schmechta H, Evers U, Pergande M, Porstmann T, Kramm, HJ, Krause H. Measurement of lysozyme in human body fluids: Comparison of various enzyme immunoassay techniques and their diagnostic application. *Clinical Biochemistry* 1989; 22(5):349–355.

Portron S, Merceron C, Gauthier O, Lesoeur J, Sourice S, Masson M, Fellah BH, Geffroy O, Lallemand E, Weiss P, Guicheux J, Vinatier C. Effects of *in vitro* low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their *in vivo* chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair. *PLoS One* 2013; 8(4):e62368.

Provot S, Zinyk D, Gunes Y, Kathri R, Le Q, Kronenberg HM, Johnson RS, Longaker MT, Giaccia AJ, Schipani E. Hif-1 $\alpha$  regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development. *The Journal of Cell Biology* 2007; 177(3):451–464.

Pullig O, Weseloh G, Klatt AR, Wagener R, Swoboda B. Matrilin-3 in human articular cartilage: Increased expression in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002; 10(4):253–263.

Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* 2010; 35:403–440.

Quentin D, Arnaud P, Etienne B, Reine B, Robin S, Marlene D, Samantha D, Laurent D, Laurence B. Colorectal wall regeneration resulting from the association of chitosan hydrogel and stromal vascular fraction from adipose tissue. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2017; 106(2):460-467.

Reissis D, Tang QO, Cooper NC, Carasco CF, Gamie Z, Mantalaris A, Tsiridis E. Current clinical evidence for the use of mesenchymal stem cells in articular cartilage repair. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2016; 16(4):535–557.

Renard E, Porée B, Chadjichristos C, Kypriotou M, Maneix L, Bigot N, Legendre F, Ollitrault D, De Crombrughe B, Malléin-Gérin F, Moslemi S, Demoor M, Boumediene K, Galéra P. Sox9/Sox6 and Sp1 are involved in the insulin-like growth factor-I-mediated

upregulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *Journal of Molecular Medicine* 2012; 90(6):649–666.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 2006; 31(7):603–632.

Rodríguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005; 87(1):125–128.

Rodríguez D. Prevalencia de la artrosis, calidad de vida y dependencia en una muestra aleatoria poblacional en personas de 40 y más años de edad. [Tesis doctoral]. Universidad de A Coruña, 2017.

Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; 21(1):105–110.

Rosales R. Aislamiento y control de calidad microanalítico para ingeniería tisular de los condrocitos del tejido cartilaginoso hialino y fibroso. [Tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada, Facultad de Medicina; 2008.

Ross MH y Pawlina W. Cartílago hialino. En: Ross MH y Pawlina W, editores. *Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. 6a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2012. Página 200.

Rowlands AS, George PA, Cooper-White JJ. Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation. *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 2008; 295(4):1037–1044.

Rubenthaler V, Ward TA, Chee CY, Tang CK. Processing and analysis of chitosan nanocomposites reinforced with chitin whiskers and tannic acid as a crosslinker. *Carbohydrate Polymers* 2015; 115:379–387.

Ruedel A, Hofmeister S, Bosserhoff AK. Development of a model system to analyze chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2013; 6(12):3042–3048.

Sabeh F, Fox D, Weiss SJ. Membrane-type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function. *The Journal of Immunology* 2010; 184(11):6396–6406.

Salaberria AM, Diaz RH, Labidi J, Fernandes SCM. Preparing valuable renewable nanocomposite films based exclusively on oceanic biomass – Chitin nanofillers and chitosan. *Reactive and Functional Polymers* 2015; 89:31–39.

Salaberria AM, Diaz RH, Labidi J, Fernandes SCM. Role of chitin nanocrystals and nanofibers on physical, mechanical and functional properties in thermoplastic starch films. *Food Hydrocolloids* 2015; 46:93–102.

Salaberria AM, Fernandes SCM, Diaz RH, Labidi J. Processing of  $\alpha$ -chitin nanofibers by dynamic high pressure homogenization: Characterization and antifungal activity against *A. niger*. *Carbohydrate Polymers* 2015; 116:286–291.

Salaberria AM, Labidi J, Fernandes SCM. Different routes to turn chitin into stunning nano-objects. *European Polymer Journal* 2015; 68:503–515.

Salaberria AM, Labidi J, Fernandes SCM. Chitin nanocrystals and nanofibers as nano-sized fillers into thermoplastic starch-based biocomposites processed by melt-mixing. *Chemical Engineering Journal* 2014; 256:356–364.

Sanjurjo-Rodríguez C, Castro-Viñuelas R, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete IM, de Toro FJ, Blanco FJ, Díaz-Prado SM. Human cartilage engineering in an *in vitro* repair model using collagen scaffolds and mesenchymal stromal cells. *International Journal of Medical Science* 2017; 14(12):1257-1262.

Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS. Hypoxia in cartilage: HIF-1 $\alpha$  is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes & Development* 2001; 15(21):2865–2876.

Schon BS, Schrobback K, van der Ven M, Stroebel S, Hooper GJ, Woodfield TBF. Validation of a high-throughput microtissue fabrication process for 3D assembly of tissue engineered cartilage constructs. *Cell and Tissue Research* 2012; 347(3):629–642.

Schubert T, Xhema D, Vériter S, Schubert M, Behets C, Delloye C, Gianello P, Dufrane D. The enhanced performance of bone allografts using osteogenic-differentiated adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2011; 32(34):8880–8891.

Schumacher BL, Block J, Schmid T, Aydelotte M KK. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the Superficial Zone of Articular Cartilage. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1994; 311(1):144-152.

Shafiee A, Soleimani M, Chamheidari GA, Seyedjafari E, Dodel M, Atashi A, Gheisari Y. Electrospun nanofiber-based regeneration of cartilage enhanced by mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2011; 99(3):467–478.

Shahid M, Kundra R. Platelet-rich plasma (PRP) for knee disorders. *EFORT Open Reviews* 2017; 2(1):28–34.

Sharma B y Elisseeff JH. Engineering structurally organised cartilage and bone tissues. *Annals of Biomedical Engineering*, 2004; 32(1):148-159.

Shearier E, Xing Q, Qian Z, Zhao F. Physiologically Low Oxygen Enhances Biomolecule Production and Stemness of Mesenchymal Stem Cell Spheroids. *Tissue Engineering Part C: Methods* 2015; 22(4):360-369.

Shen FH, Werner BC, Liang H, Shang H, Yang N, Li X, Shimer AL, Balian G, Katz AJ. Implications of adipose-derived stromal cells in a 3D culture system for osteogenic differentiation: An *in vitro* and *in vivo* investigation. *The Spine Journal* 2013; 13(1):32–43.

Sherwood J, Bertrand J, Nalesso G, Poulet B, Pitsillides A, Brandolini L, Karystinou A, De Bari C, Luyten FP, Pitzalis C, Pap T, Dell'Accio F. A homeostatic function of CXCR2 signalling in articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Disease* 2014; 74(12):2207–2215.

Shi Y, Ma J, Zhang X, Li H, Jiang L, Qin J. Hypoxia combined with spheroid culture improves cartilage specific function in chondrocytes. *Integrative Biology* 2015; 7(3):289–297.

Shri M, Agrawal H, Rani P, Singh D, Onteru SK. Hanging drop, a best three-dimensional (3d) culture method for primary buffalo and sheep hepatocytes. *Scientific Reports* 2017; 7(1):1203.

Sonomoto K, Yamaoka K, Kaneko H, Yamagata K, Sakata K, Zhang X, Kondo M, Zenke Y, Sabanai K, Nakayamada S, Sakai A, Tanaka Y. Spontaneous differentiation of human mesenchymal stem cells on poly-lactic-co- glycolic acid nano-fiber scaffold. *PLoS One* 2016; 11(4):e0153231.

Sridharan BP, Laflin AD, Detamore MS. Generating chondromimetic mesenchymal stem cell spheroids by regulating media composition and surface coating. *Cellular and Molecular Bioengineering* 2018; 11(2):99–115.

Sriupayo J, Supaphol P, Blackwell J, Rujiravanit R. Preparation and characterization of  $\alpha$ -chitin whisker-reinforced chitosan nanocomposite films with or without heat treatment. *Carbohydrate Polymers* 2005; 62(2):130–136.

Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: Average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 2003; 19(5):477–484.

Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells and Development* 2012; 21(14):2724–2752.

Stuart MP, Matsui RAM, Santos MFS, Côrtes I, Azevedo MS, Silva KR, Beatrice A, Leite PEC, Falagan-Lotsch P, Granjeiro JM, Mironov V, Baptista LS. Successful low-cost scaffold-free cartilage tissue engineering using human cartilage progenitor cell spheroids formed by micromolded nonadhesive hydrogel. *Stem Cells International* 2017; 2017:7053465.

Stubbs SL, Hsiao STF, Peshavariya HM, Lim SY, Dusting GJ, Dilley RJ. Hypoxic preconditioning enhances survival of human adipose-derived stem cells and conditions endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells and Development* 2012; 21(11):1887–1896.

Sun C, Chou S, Lai J, Cho C, Lee C. Dependence of corneal keratocyte adhesion, spreading, and integrin  $\beta 1$  expression on deacetylated chitosan coating. *Material Science and Engineering: Part C* 2016; 63:222–230.

Sun H, Hu S, Zhang Z, Lun J, Liao W, Zhang Z. Expression of exosomal microRNAs during chondrogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2018; 120:171–181.

Suzuki S, Muneta T, Tsuji K, Ichinose S, Makino H, Umezawa A, Sekiya I. Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Research & Therapy* 2012; 14(3):R136.

Taheem DK, Foyt DA, Loaiza S, Ferreira SA, Ilic D, Auner HW, Grigoriadis AE, Jell G, Gentelman E. Differential regulation of human bone marrow mesenchymal stromal cell chondrogenesis by hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  hydroxylase. *Stem Cells* 2018; 36(9):1380–1392.

Takahara M, Harada M, Guan D, Otsuji M, Naruse T, Takagi M, Ogino T. Developmental failure of phalanges in the absence of growth/differentiation factor 5. *Bone* 2004; 35(5):1069–1076.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006; 126(4):663–676.

Takigawa Y, Hata K, Muramatsu S, Amano K, Ono K, Wakabayashi M, Matsuda A, Takada K, Nishimura R, Yoneda T. The transcription factor Znf219 regulates chondrocyte differentiation by assembling a transcription factory with Sox9. *Journal of Cell Science* 2010; 123(Pt 21):3780–3788.

Tamaddon M, Burrows M, Ferreira SA, Dazzi F, Apperley JF, Bradshaw A, Brand DD, Czernuszka J, Gentleman E. Monomeric, porous type II collagen scaffolds promote chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. *Scientific Reports* 2017; 7:43519.

Tamariz E, Rios-Ramírez A. Biodegradation of medical purpose polymeric materials and their impact on biocompatibility. En: Chamy R, editor. Biodegradation Live of Science. 1º ed. IntechOpen; 2013. Páginas 4-24.

Tan H, Chu CR, Payne KA, Marra KG. Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2009; 30(13):2499–2506.

Tang F, Lv L, Lu F, Rong B, Li Z, Lu B, Yu K, Liu J, Dai F, Wu D, Lan G. Preparation and characterization of N-chitosan as a wound healing accelerator. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016; 93(Pt A):1295–1303.

Tao K, Rey-Rico A, Frisch J, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Lin J, Cucchiari M. rAAV-mediated combined gene transfer and overexpression of TGF- $\beta$  and SOX9 remodels human osteoarthritic articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* 2016; 34(12):2181–2190.

Temel A, Kazokoglu H, Taga Y. Tear Lysozyme Levels in Contact Lens Wearers. *Annals Ophthalmology* 1991; 23(5):191–194.

Temenoff JS, Mikos AG. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000; 21(5):431–440.

Temu TM, Wu KY, Gruppuso PA, Phornphutkul C. The mechanism of ascorbic acid-induced differentiation of atdc5 chondrogenic cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2010; 229(2):325–334.

Ter Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, De Munter W, Grevers LC, Jeanson J, Noël D, Casteilla L, Jorgensen C, Van Den Berg W, Van Lent PLEM. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2012; 64(11):3604–3613.

Thambyah A, Broom N. On how degeneration influences load-bearing in the cartilage-bone system: a microstructural and micromechanical study. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007; 15(12):1410–1423.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391):1145–1147.

Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology Bioengineering* 2009, 103(4):655–663.

Tolar J, Le Blanc K, Keating A, Blazar BR. Concise review: Hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2010; 28(8):1446–1455.

Tomihata K, Ikada Y. *In vitro* and *in vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* 1997; 18(7):567–575.

Torrie AM, Kesler WW, Elkin J, Gallo RA. Osteochondral allograft. *Current Review in Musculoskeletal Medicine* 2015; 8(4):413–422.

Tran-Khanh N, Hoemann CD, McKee MD, Henderson JE, Buschmann MD. Aged bovine chondrocytes display a diminished capacity to produce a collagen-rich, mechanically functional cartilage extracellular matrix. *Journal of Orthopaedic Research* 2005; 23(6):1354–1362.

Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. *Cell Stem Cell* 2015; 17(1):11–22.

Uchimura T, Hollander JM, Nakamura DS, Liu Z, Rosen CJ, Georgakoudi I, Zeng L. An essential role for IGF2 in cartilage development and glucose metabolism during postnatal long bone growth. *Development* 2017; 144(19):3533–3546.

Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. *Bioscience Reports* 2015; 35(2):e00191.

Ungrin MD, Joshi C, Nica A, Bauwens C, Zandstra P. Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension- derived human embryonic stem cell aggregates. *Plos One* 2008; 3(2):e1565.

Vaca-González JJ, Gutiérrez ML, Garzón-Alvarado DA. Cartílago articular: estructura, patologías y campos eléctricos como alternativa terapéutica. Revisión de conceptos actuales. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología* 2017; 31(4):202–210.

van Wachem PB, Beugeling T, Feijen J, Bantjes a, Detmers JP, Aken van WG. Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials* 1985; 6(6):403–408.

VandeVord PJ, Matthew HWT, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *Journal of Biomedical Material Research* 2002; 59(3):585–590.

Varoni EM, Vijayakumar S, Canciani E, Cochis A, De Nardo L, Lodi G, Rimondini L, Cerruti M. Chitosan-based trilayer scaffold for multitissue periodontal regeneration. *Journal of Dental Research* 2017; 97(3):303–311.

Vårum KM, Myhr MM, Hjerde RJN, Smidsrød O. *In vitro* degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydrate Research* 1997; 299(1-2):99–101.

Velzenberger E, Kirat K El, Legeay G, Nagel MD, Pezron I. Characterization of biomaterials polar interactions in physiological conditions using liquid-liquid contact angle measurements. Relation to fibronectin adsorption. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2009; 68(2):238–244.

Velzenberger E, Kirat K El, Legeay G, Nagel MD, Pezron I. Characterization of biomaterials polar interactions in physiological conditions using liquid-liquid contact angle measurements. Relation to fibronectin adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2009; 68(2):238–244.

Vériter S, André W, Aouassar N, Poirel HA, Lafosse A, Docquier PL, Dufrane D. Human adipose-derived mesenchymal stem cells in cell therapy: Safety and feasibility in different “hospital exemption” clinical applications. *PLoS One* 2015; 10(10):e0139566.

Vetter U, Zapf J, Heit W, Helbing G, Heinze E, Froesch ER, Teller WM. Human fetal and adult chondrocytes. Effect of insulinlike growth factors I and II, insulin, and growth hormone on clonal growth. *The Journal of Clinical Investigation* 1986; 77(6):903–908.

Vilar JM, Batista M, Morales M, Santana A, Cuervo B, Rubio M, Cugat R, Sopena J, Carrillo JM. Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. *BMC Veterinary Research* 2014; 10:143.

Vinatier C, Guicheux J. Cartilage tissue engineering: from biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 2016; 59(3):139–144.

Vincent TL, McLean CJ, Full LE, Peston D, Saklatvala J. FGF-2 is bound to perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, where it acts as a chondrocyte mechanotransducer. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007; 15(7):752–763.

Vincourt JB, Vignaud JM, Lionneton F, Sirveaux F, Kawaki H, Marchal S, Lomazzi S, Plénat F, Guillemain F, Netter P, Takigawa M, Mainard D, Magdalou J. Increased expression of matrilin-3 not only in osteoarthritic articular cartilage but also in cartilage-forming tumors, and down-regulation of SOX9 via epidermal growth factor domain 1-dependent signaling. *Arthritis Rheumatology* 2008; 58(9):2798–2808.

Visser J, Melchels FPW, Jeon JE, Van Bussel EM, Kimpton LS, Byrne HM, Dhert WJA, Dalton PD, Hutmacher DW, Malda J. Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibrils. *Nature Communications* 2015; 6:6933.



Vunjak-Novakovic G. The fundamentals of tissue engineering: scaffolds and bioreactors. In: *Tissue Engineering of Cartilage and Bone* (Novartis Foundation Symposium). Editors: Bock G and Goode J. John Wiley & Sons Ltd, Chichester:2003. Páginas 34-51.

Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors *in vitro*: Relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology* 2011; 40(1):74–83.

Walter MNM, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WEB. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An *in vitro* study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Experimental Cell Research* 2010; 316(7):1271–1281.

Walter SG, Ossendorff R, Schildberg FA. Articular cartilage regeneration and tissue engineering models : a systematic review. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 2018.

Wan Safwani WKZ, Choi JR, Yong KW, Ting I, Mat Adenan NA, Pinguan-Murphy B. Hypoxia enhances the viability, growth and chondrogenic potential of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology* 2017; 75:91–99.

Wang J, Markova D, Anderson DG, Zheng Z, Shapiro IM, Risbud M V. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  promote a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type I motif-5-mediated aggrecan degradation through syndecan-4 in intervertebral disc. *The Journal of Biological Chemistry* 2011; 286(46):39738–39749.

Wang Q, Chen S, Chen D. Preparation and characterization of chitosan based injectable hydrogels enhanced by chitin. *Journal of Mechanical Behaviour of Biomedical Materials* 2017; 65:466–477.

Wang W, Itaka K, Ohba S, Nishiyama N, Chung U il, Yamasaki Y, Kataoka K. 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2009; 30(14):2705–2715.

Wang Y, Yuan M, Guo QY, Lu SB, Peng J. Mesenchymal stem cells for treating articular cartilage defects and osteoarthritis. *Cell Transplantation* 2015; 24(9):1661–1678.

Wang Y, Zhu G, Li N, Song J, Wang L, Shi X. Small molecules and their controlled release that induce the osteogenic/chondrogenic commitment of stem cells. *Biotechnology Advances* 2015; 33(8):1626–1640.

Wang YK, Yu X, Cohen DM, Wozniak MA, Yang MT, Gao L, Eyckmans J, Chen CS. Bone morphogenetic protein-2-induced signaling and osteogenesis is regulated by cell shape,

rhoa/rock, and cytoskeletal tension. *Stem Cells and Development* 2012; 21(7):1176–1186.

Wheeler HE, Wing C, Delaney SM, Komatsu M, Dolan ME. Modeling chemotherapeutic neurotoxicity with human induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells. *PLoS One* 2015; 10(2):e0118020.

Williams GM, Klisch SM, Sah RL. Bioengineering cartilage growth, maturation, and form. *Pediatric Research* 2008; 63(5):527–534.

Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheumatology* 2003; 48(2):418–429.

Wluka AE, Lombard CB, Cicuttini FM. Tackling obesity in knee osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2013; 9(4):225–235.

Wu H, Liu J, Fang Q, Xiao B, Wan Y. Establishment of nerve growth factor gradients on aligned chitosan-poly(lactide /alginate) fibers for neural tissue engineering applications. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 2017; 160:598–609.

Xu Y, Malladi P, Chiou M, Bekerman E, Giaccia AJ, Longaker MT. *In vitro* expansion of adipose-derived adult stromal cells in hypoxia enhances early chondrogenesis. *Tissue Engineering* 2007; 13(12):2981–2993.

Yang CY, Chanalaris A, Troeberg L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis – looking beyond the “usual suspects.” *Osteoarthritis and Cartilage* 2017; 25(7):1000–1009.

Yeh HY, Hsieh FY, Hsu S. Self-patterning of adipose-derived mesenchymal stem cells and chondrocytes cocultured on hyaluronan-grafted chitosan surface. *Biointerphases* 2016; 11(1):11011.

Yeul VS, Rayalu SS. Unprecedented Chitin and Chitosan: A Chemical Overview. *Journal of Polymers and the Environment* 2013; 21(2):606–614.

Ylöstalo JH, Bartosh TJ, Coble K, Prockop DJ. Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells* 2012; 30(10):2283–2296.

Yoon HH, Bhang SH, Shin JY, Shin J, Kim BS. Enhanced cartilage formation via three-dimensional cell engineering of human adipose-derived stem cells. *Tissue Engineering Part A* 2012; 18(19–20):1949–1956.

Young B, O'Dowd G, Woodford P. Tejidos conjuntivos/de sostén. En: Wheater Histología funcional. Texto y atlas en color. 6a ed. Barcelona: Elsevier; 2014. Páginas 180-181.

Zahiri S, Masaeli E, Poorazizi E, Nasr-Esfahani MH. Chondrogenic response in presence of cartilage extracellular matrix nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2018; 106(9):2463–2471.

Zhai G, Van Meurs JBJ, Livshits G, Meulenbelt I, Valdes AM, Soranzo N, Hart D, Zhang F, Kato BS, Richards JB, Williams FMK, Inouye M, Kloppenburg M, Deloukas P, Slagboom E, Uitterlinden A, Spector TD. A genome-wide association study suggests that a locus within the ataxin 2 binding protein 1 gene is associated with hand osteoarthritis: the Treat-OA consortium. *Journal of Medical Genetics* 2009; 46(9):614–616.

Zhang H, Neau SH. *In vitro* degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: Effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 2001; 22(12):1653–1658.

Zhang K, Yan S, Li G, Cui L, Yin J. *In-situ* birth of MSCs multicellular spheroids in poly(l-glutamic acid)/chitosan scaffold for hyaline-like cartilage regeneration. *Biomaterials* 2015; 71:24–34.

Zhang P, Li J, Tan Z, Wang C, Liu T, Chen L, Yong J, Jiang W, Sun X. Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood* 2008; 111(4):1933–1942.

Zhang Y, Xue C, Xue Y, Gao R, Zhang X. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research* 2005; 340(11):1914–1917.

Zhang Y, Yang F, Liu K, Shen H, Zhu Y, Zhang W, Liu W, Wang S, Cao Y, Zhou G. The impact of PLGA scaffold orientation on invitro cartilage regeneration. *Biomaterials* 2012 33(10):2926–2935.

Zhao M, Chen Z, Liu K, Wan Y, Li X, Luo X, Bai Y, Yang Z, Feng G. Repair of articular cartilage defects in rabbits through tissue-engineered cartilage constructed with chitosan hydrogel and chondrocytes. *Journal of Zhejiang University Science B* 2015; 16(11):914–923.

Zhou Y, Liang K, Zhao S, Zhang C, Li J, Yang H, Liu X, Yin X, Chen D, Xu W, Xiao P. Photopolymerized maleilated chitosan/methacrylated silk fibroin micro/nanocomposite hydrogels as potential scaffolds for cartilage tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018; 108:383–390.

Zomer HD, Vidane AS, Gonçalves NN, Ambrósio CE. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: General insights and clinical perspectives. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* 2015; 8:125–134.

Zou F, Li R, Jiang J, Mo X, Gu G, Guo Z, Chen Z. Mechanical enhancement and *in vitro* biocompatibility of nanofibrous collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomaterial Science, Polymer Edition* 2017; 28(18):2255–2270.

Zubillaga V, Salaberria AM, Palomares T, Kootala S, Labidi J, Fernandes SCM. Chitin nanoforms provide mechanical and topological cues to support growth of human adipose stem cells in chitosan matrices. *Biomacromolecules* 2018; 19(7):3000–3012.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001; 7(2):211–28.