

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

---

ESTUDIO IN VITRO PARA LA EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE  
ANDAMIOS A BASE DE POLICAPROLACTONA (PCL) Y ÁCIDO POLI-  
LÁCTICO (PLA) PARA REEMPLAZO DE TEJIDO CARTILAGINOSO

TRABAJO ESCRITO CORRESPONDIENTE A LA OPCIÓN DE TITULACIÓN:  
CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:  
**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTA:  
**CIRCE GARZÓN GUZMÁN**

DIRIGIDA POR :

DRA. ATLÁNTIDA MARGARITA RAYA RIVERA  
DRA. ESTELA FLORES GÓMEZ

Ciudad de México a, 30 de noviembre, 2016

-----

## Autorización de uso de obra

**Instituto Politécnico Nacional**  
**P r e s e n t e**

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe, **Circe Garzón Guzmán**, manifiesto ser autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada **“Estudio in vitro para la evaluación de la viabilidad de andamios a base de Policaprolactona (PCL) y Ácido Poli-Láctico (PLA) para reemplazo de tejido cartilaginoso”**, en adelante “La Tesis” y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales **el uso del presente escrito con fines científicos en uso electrónico y físico** “La Tesis” por un periodo de **un año** contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a “El IPN” de su terminación.

En virtud de lo anterior, “El IPN” deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de “La Tesis”.

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de “La Tesis”, manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de “La Tesis”, por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de “La Tesis” o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

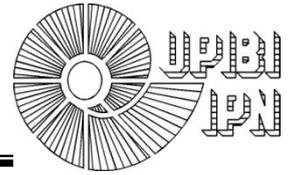
México, D. F., 30 de noviembre de 2016

Atentamente



---

Circe Garzón Guzmán



## SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA

### ACTA DE TRABAJO ESCRITO

En la Ciudad de México el día 30 de noviembre del 2016, siendo las 12:30 horas se reunieron los integrantes de la Comisión de Evaluación para Opción Curricular con el fin de revisar el trabajo escrito titulado: "**Estudio in vitro para la evaluación de la viabilidad de andamios a base de Policaprolactona (PCL) y Ácido Poli-Láctico (PLA) para reemplazo de tejido cartilaginoso**" que presenta el alumno **Circe Garzón Guzmán** con número de boleta **2012620144**, aspirante a Ingeniero Biotecnólogo.

Después de intercambiar opiniones los integrantes de la Comisión de Evaluación manifiestan APROBAR EL TRABAJO ESCRITO, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para la opción curricular de titulación.

### COMISIÓN REVISORA.

Dra. Atlántida Margarita Raya Rivera

Dra. Estela Flores Gómez

I.B.T. Jocelyn Berénice Sanchez Arellano

Dra. Doraj Ramírez López

Nombre y firma  
Director de Programa Académico

## Agradecimientos

*“There are places I'll remember  
All my life, though some have changed  
Some forever, not for better  
Some have gone and some remain  
All these places have their moments  
With lovers and friends I still can recall  
Some are dead and some are living  
In my life, I've loved them all”*

Y es así como comienza el inicio del fin para esta etapa de mi vida, se abren nuevos horizontes y es momento de abrir un poco más mis alas; alas que de no ser por esas personas permanentes y esas personas fugaces no serían lo que hoy son.

A Papá, mamá y Elida; que me han apoyado a lo largo de mi vida.

A mis primos, tíos, sobrinos y abuelos; por sus palabras de aliento aún con la distancia.

A Noé, Adriana, Miguel y Jessica; que hicieron de la vocacional una aventura grandiosa.

A mis colegas Víctor Manuel, Aline, Claudia, Marco, Norma y Cielo; quienes me regalaron grandes momentos en UPIBI.

A David Erick, Alejandro Isair, Juan Manuel, Marivi, Ame y Luis Miguel; por su oído calmo y glosa de plata; gracias por no dejarme enloquecer.

A la Dra. Atlántida Raya, el Dr. Diego Esquiliano, la Ing. Alida Ospina y Adriana; por el apoyo para la elaboración de este trabajo y por todo el conocimiento compartido.

*Para esa pequeña familia que uno elige*

*I get by with a little help from my friends  
I get high with a little help from my friends  
I gonna try with a little help from my friends*

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1 Ingeniería de tejidos.....	9
2.1.1 Fundamento.....	9
2.1.2 Elementos de la Ingeniería de Tejidos .....	11
2.1.2.1 Células .....	11
2.1.2.2 Factores de crecimiento .....	12
2.1.2.3 Andamios o scaffolds .....	15
2.1.2.3.1 Biomateriales.....	17
2.1.2.3.1.1 Orgánicos .....	18
2.1.2.3.1.2 Cerámicos .....	18
2.1.2.3.1.3 Poliméricos.....	19
2.1.2.3.1.4 Metálicos .....	19
2.1.2.3.1.5 Semiconductores.....	19
2.2 Articulaciones.....	19
2.2.1. Las células del tejido cartilaginoso .....	26
2.2.1.1 Condroblastos .....	26
2.2.1.2 Condrocitos.....	27
2.2.1.3 Condroclastos .....	30
2.2.1.4 Fibrocondrocitos.....	30
2.3 Generación del andamio para reemplazo de cartílago .....	31
2.3.1 Técnica de electrohilado o electrospinning para la síntesis de los andamios de PCL-PLA.....	31
2.3.2 Características de los polímeros .....	34
2.3.2.1 Policaprolactona.....	34
2.3.2.2 Ácido poli-láctico .....	34
2.4 Procedimientos a utilizar para la evaluación de viabilidad del polímero.....	35
2.4.1 Viabilidad por MTT .....	35
2.4.2 Inmunohistoquímica.....	37
2.4.2.1 Kit DAKO.....	38
3. JUSTIFICACIÓN.....	39
4. OBJETIVOS.....	40
4.1 Objetivo general.....	40
4.2 Objetivos particulares.....	40
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
5.1 Obtención del tejido cartilaginoso.....	41
5.2 Cultivo celular de tejido cartilaginoso .....	43
5.4 Pase celular .....	45
5.5 Siembra y fijación en laminillas LabTech para Inmunihistoquímica .....	46
5.6 Inmunohistoquímica .....	46
5.6.1 Preparación del Anticuerpo .....	46
5.6.2 Preparación de muestras .....	47
5.7 Proliferación / Viabilidad De Células Cartilaginosas en el polímero .....	50
6. RESULTADOS .....	51
6.1 Inmunohistoquímica .....	51
6.2 Viabilidad por MTT .....	52
7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	53

7.1 Inmunohistoquímica.....	53
7.2 Viabilidad por MTT.....	54
8. CONCLUSIONES.....	54
9. RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES FUTURAS.....	54
10. BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXOS.....	67
Anexo 1: Reactivos utilizados en el laboratorio de ingeniería de tejidos.....	68
Anexo 2: Conteo celular con cámara de Neubauer.....	71
Anexo 3: Memoria de cálculo “Preparación de disolución de anticuerpos”.....	73
Anexo 4: Fichas técnicas.....	75
Anexo 5: Memoria de cálculo “Prueba de viabilidad por el método de MTT”.....	78

## 1.RESUMEN

Existen numerosas patologías cartilaginosas cuya frecuencia ha ido en incremento a nivel mundial, generando un problema de salud y económico. Dentro de las enfermedades que afectan el cartílago esta la osteoartritis (OA), responsable del 50% de las patologías congénitas crónicas en la población de avanzada edad, que consiste en la degradación del tejido cartilaginoso, el cual, al regenerarse pierde propiedades biomecánicas esenciales; razón por la que se considera a la Ingeniería de tejidos como una de las alternativas más viables para la solución de este problema.

El éxito de la ingeniería de tejidos depende del desarrollo de matrices en las que sea posible la proliferación y mantenimiento celular. En este proyecto será comparada la capacidad de dos matrices de Policaprolactona (PCL) y Ácido poli-láctico (PLA) con y sin Agrecano para reemplazo de cartílago.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 *Ingeniería de tejidos*

El daño total o parcial de tejido y la pérdida de la función de un órgano se encuentran entre los problemas más graves y costosos de la salud humana. Inicialmente, esos problemas se habían abordado mediante el trasplante de órganos y tejidos alogénicos, sin embargo, esta ya no es una opción por la baja disponibilidad de donantes (Estrada, Paz, & López, 2006; Langer & Vacanti, 1993); como alternativa de solución a estos problemas, surge la ingeniería de tejidos, definida como "una ciencia interdisciplinaria donde se aplican principios de ingeniería y las ciencias de la vida para crear sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido u órgano que ha sido afectado" (Rincón, Rodríguez, Londoño, & Echevarría, 2007; Vunjak-Novakovic & Freshney, 2006).

El éxito de la ingeniería de tejidos depende del desarrollo de matrices porosas que proporcionen el soporte necesario a las células para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas o señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión específica de los genes en el tejido (Ma & Wei, 2005, 2003; Rincón, Rodríguez, Londoño, & Echevarría, 2007; Salgado, Coutinho, & Reis, 2004).

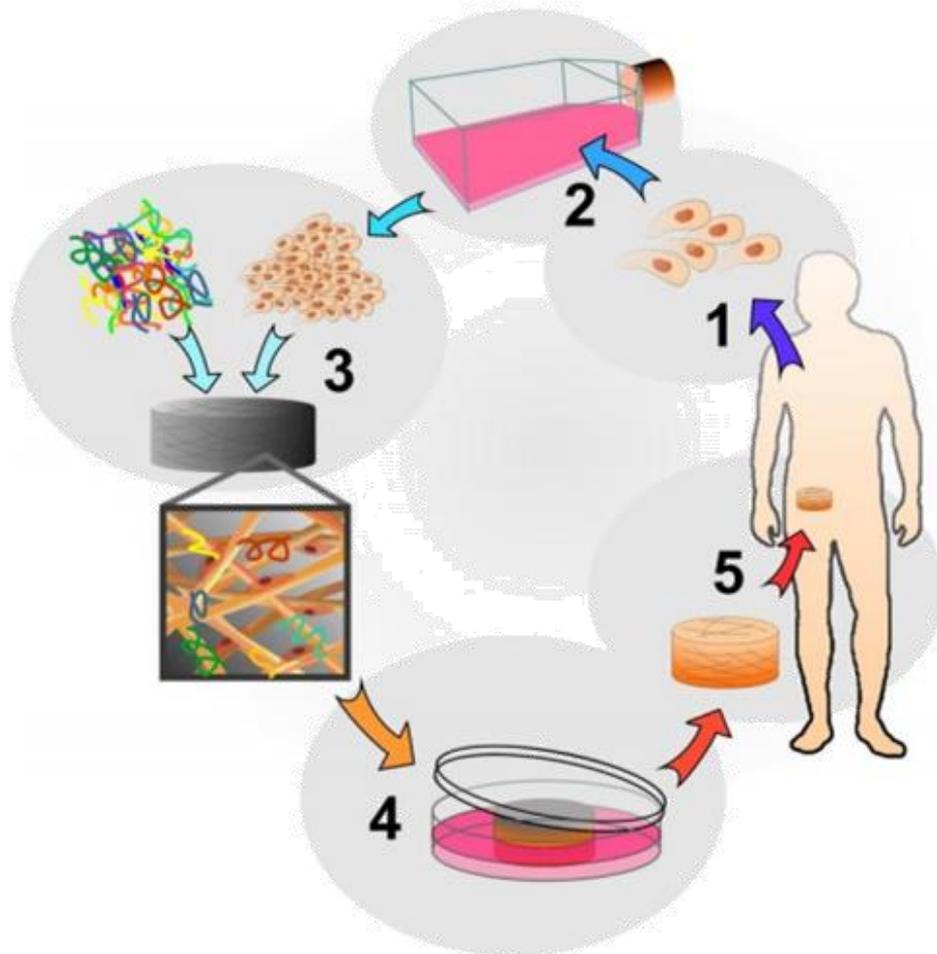
La ingeniería de tejidos o tisular puede considerarse lo más novedoso en el campo de la medicina y los biomateriales. Nació en 1987 (Lanza, Langer, & Vacanti, 2007; Colorado, Agueldo, & Moncada, 2013) y es un área multidisciplinaria que para llevar a cabo sus objetivos involucra la participación de ingenieros químicos, ingenieros mecánicos, biólogos y médicos, entre otros (Narváez, 2016).

#### 2.1.1 *Fundamento*

La célula es la unidad mínima fisiológica, morfológica y genética. Cuando las células tienen funciones similares, estas se adhieren para formar un tejido. La responsable de esta adhesión es la matriz extracelular, además es responsable del transporte de las señales de desarrollo, nutrientes, productos de desecho y migración celular. Los componentes la matriz celular son, principalmente, colágeno,

proteoglucanos y una variedad de glucoproteínas especializadas como fibrinectina y laminina (Gilbert, 2005).

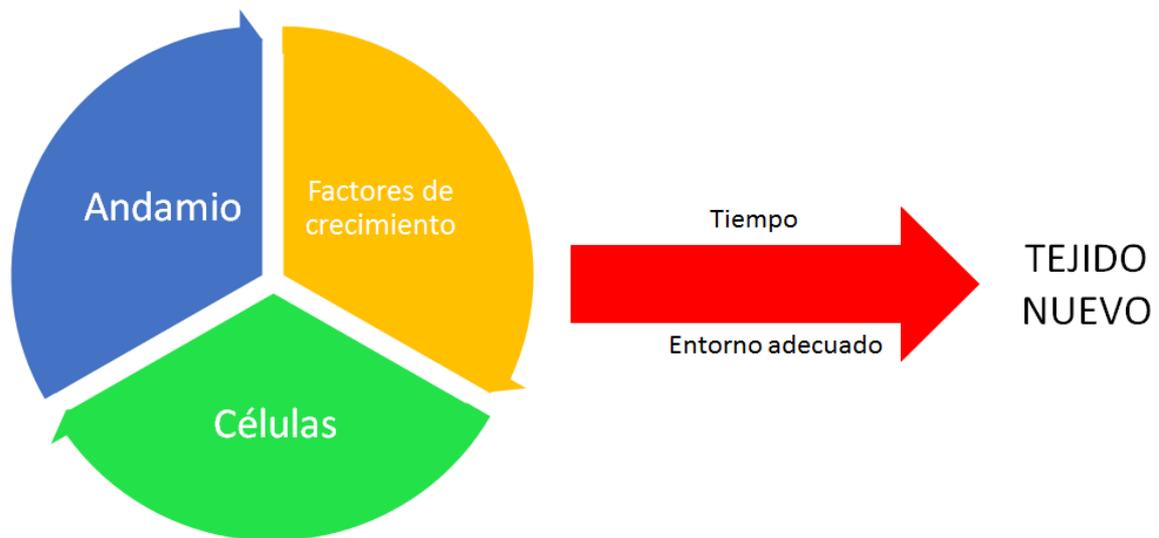
Al entender cómo responden las células a las señales, cómo interactúan con su entorno y cómo se organizan en tejidos, los investigadores han podido manipular estos procesos para sanar los tejidos dañados o incluso crear nuevos; este proceso comienza con la construcción del andamio con biomateriales; a los que es posible introducir células y factores de crecimiento o moléculas de señalización. Si el andamio es dispuesto al entorno adecuado, se desarrollará un tejido nuevo capaz de reparar o sanar las áreas afectadas (Figura 1) (Instituto Nacional de Bioingeniería e Imágenes Biomédicas, 2013; Roa Ramirez & Quintian Ayala, 2016).



**Figura 1: Roa, D. (2016). Proceso de elaboración de un tejido artificial a partir de Ingeniería de Tejidos.**

### 2.1.2 Elementos de la Ingeniería de Tejidos

Los elementos básicos para la generación de un tejido a partir de la Ingeniería de Tejidos son las células específicas que forman el tejido deseado, el andamio, que funciona como sostén para dichas células y los medios enriquecidos con factores de crecimiento o moléculas de señalización (Figura 2).



**Figura 2: Elementos básicos para la generación de un tejido nuevo a partir de Ingeniería de Tejidos.**

#### 2.1.2.1 Células

Las células ideales para la construcción de un tejido deben ser fáciles de extraer y expandir, deben conservar su fenotipo, y ser multipotenciales para diferenciarse o transdiferenciarse a una variedad de células especializadas, específicas de tejidos u órganos y no deben generar respuestas inmunes (Yang, Leong, Du , & Chua, 2001; Estrada, Paz, & López, 2006), La edad del donante, el origen y el estado de diferenciación de las células son factores fundamentales, que pueden hacer variar los resultados obtenidos (González Fernández, 2014; Buckwalter, Mankin, & Grodzinsky , 2005; Vunjak-Novakovic & Freshney, Culture of cells of tissue engineering, 2006), los factores anteriores han despertado gran interés en las células madre (Tabla 1) (Pittenger, y otros, 1999).

**Tabla 1: Células madre más estudiadas para la generación de tejidos a través de la ingeniería de tejidos. (Estrada, Paz, & López, 2006; Lanza, Langer, & Vacanti, 2000; Pittenger, y otros, 1999; Mauney, Volloch, & Kaplan, 2005; Alvarez Barreto, 2009).**

<b>Células madre embrionarias</b>	<b>Células madre adultas</b>
Botón embrionario, fetales, amnióticas, cordón umbilical.	Médula ósea (células madre hematopoyéticas, células progenitoras endoteliales, células madre mesenquimales), tejido adiposo, células madre pluripotentes inducidas.

Las células interactúan con el material del andamio y responden a cualquier estímulo del medio en el que se encuentran, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, la elección del tipo y fuente celular adecuado afectará todas y cada una de las etapas de producción del implante (Tabla 2) (Alvarez Barreto, 2009; Colorado, Aguelo, & Moncada, 2013; Lanza, Langer, & Vacanti, 2007).

**Tabla 2: Clasificación de implantes según la fuente celular (Lanza, Langer, & Vacanti, 2007).**

<b>Autólogo</b>	Se utilizan células del paciente, por lo que no hay reacciones inmunológicas pero existe la posibilidad de que exista baja disponibilidad de células
<b>Alogénico</b>	Se utilizan células de otro paciente de la misma especie, puede generar respuestas inmunológicas, pero asegura la disponibilidad de la especie celular requerida. Requiere tratamiento inmunológico previo a la implantación.
<b>Xenogénico</b>	Se utilizan células de distintas especies, puede contener virus por lo que la posibilidad de generar respuesta inmunológica es alta. Requiere tratamiento inmunológico previo a la implantación.

#### 2.1.2.2 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son polipéptidos solubles secretados para instruir la respuesta específica celular en el entorno biológico, (Kangwon, Eduardo, & David, 2010;

Cross & Dexter, 1991) estos pueden estimular la maduración celular, actuar como mitógenos promoviendo la proliferación de ciertos tipos de células como morfógenos induciendo el cambio en el fenotipo de las células blanco (Tabla 3) (Estrada, Paz, & López, 2006; Alvarez Barreto, 2009).

**Tabla 3: Factores de crecimiento populares en la ingeniería de tejidos (Kangwon, Eduardo, & David, 2010)**

<b>PDGF</b>	<b>Factor de crecimiento derivado de plaquetas</b>
<b>Ang</b>	Angiopoyetina
<b>bFGF</b>	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
<b>BMP</b>	Proteína morfogenética ósea
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidermal
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular endotelial
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante

La respuesta celular específica generada por el factor de crecimiento resulta en una amplia gama de reacciones celulares, que incluyen la supervivencia celular, control de migración, diferenciación y proliferación de distintos subconjuntos celulares. (Kangwon, Eduardo, & David, 2010)

Estudios relativamente recientes han permitido identificar un importante número de moléculas solubles producidas por las células madre, que una vez liberadas provocan autoestimulación en los sitios dañados y actúan sobre las células sanas en un microambiente apropiado. También se han señalado las ventajas del uso de plaquetas como fuente de factores regenerativos, teniendo en cuenta la cantidad de estos elementos solubles que ellas contienen (Hernández Ramírez, 2009; Lange, y otros, 2007).

Gran parte de las enfermedades que se pueden ver beneficiadas por la ingeniería de tejidos se deben a trastornos en que interactúan diferentes factores celulares y no a la falta de una sola proteína, por lo que se ha considerado la posibilidad de aportar moléculas activadoras y reguladoras producidas o inducidas por ellas, con capacidad para favorecer la diferenciación de las células implantadas y también la estimulación de las células propias del tejido receptor, lo que contribuiría a la fisiológica del tejido dañado (Hernández Ramírez, 2009; Estrada, Paz, & López, 2006; What is regenerative medicine? Emergence of applied stem cell and developmental biology., 2004; Hernández, 2006).

Actualmente, existen terapias de regeneración basadas en los factores de crecimiento que han tenido cierto grado de éxito. Muchos de estos tratamientos consisten en inyectar una solución del factor en la zona afectada. Esta forma de aplicación es ineficiente debido a la difusión de la solución a otras áreas del cuerpo y puede causar efectos secundarios indeseados, como el alcance de concentraciones localizadas de la sustancia superiores a la máxima segura; estos tratamientos implican la necesidad de repetidas inyecciones haciendo de la terapia un procedimiento altamente costoso. En los últimos años, se han buscado formas más eficientes de dosificar estos factores de crecimiento a través de técnicas de encapsulamiento, logrando un perfil de administración más adecuado (DeFail, Chu, Izzo, & Marra, 2006).

Tanto hidrogeles, andamios prefabricados y micro y nanoesferas, se han visto enriquecidos con factores de crecimiento (DeFail, Chu, Izzo, & Marra, 2006; Chung,

Tsai, Hsieh, & Tsai, 2006; Evangelista, y otros, 2007; Kempen , y otros, 2008; Lee, y otros, 2006; Malaekheh-Nikouei, 2006; Zolnik, 2008). No obstante, debido a su proceso de producción y purificación, los factores de crecimiento son altamente costosos y la oportunidad de obtener una terapia práctica y accesible para la población en general sería poco probable en términos prácticos (Alvarez Barreto, 2009).

### 2.1.2.3 Andamios o scaffolds

Son matrices tridimensionales que proporcionan a las células el apoyo necesario para su adhesión, proliferación, migración celular y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas y las señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión génica específica y, además, definen la arquitectura del tejido (Tabla 4) (Kim, E., & Atala, 2000; Estrada, Paz, & López, 2006; Alvarez Barreto, 2009; Lanza, Langer, & Vacanti, 2000; Saltzman, 2000).

Las células interactúan con estos dispositivos de manera activa en el proceso de regeneración del tejido, lo cual induce la liberación de factores de diferenciación y crecimiento, mientras que sintetizan su propia matriz extracelular, que proporciona un ambiente y arquitectura específicos del tejido, y sirve como reservorio de agua, nutrientes, citocinas y factores de crecimiento, entre otros (Agrawal & Ray, 2001; Kuboki, y otros, 1993; Laurencin, Ambrosio, Borden, & Cooper, 1999; Langer & Vacanti, 1993; Estrada, Paz, & López, 2006).

**Tabla 4: Clasificación de andamios según su estructura. Basada en Alvarez Barreto, 2009 y Gomes, 2005**

<b>Inyectables (hidrogeles)</b>	Son introducidos en forma líquida a la lesión, llevan a cabo un entrecruzamiento in situ, por lo que la forma del tejido a reemplazar no es un obstáculo para este tipo de andamio. Son poco invasivos y pueden resultar citotóxicos. Sus propiedades mecánicas son inferiores a las de andamios prefabricados
<b>Pre-fabricados</b>	Se construyen antes de ser implantados. Poseen mejores propiedades mecánicas, por lo que se usan en zonas de alta carga.
<b>Biomiméticos</b>	Pueden presentar características bioquímicas del tejido. Actualmente, se encuentran en desarrollo.

Las matrices para Ingeniería de tejidos deben satisfacer varios criterios (Falke & Atala, 2000; Cassinelli & Morra, 2003; Salgado, Coutinho, & Reis, 2004; Shieh & Vacanti, 2005; Mauney, Volloch, & Kaplan, 2005; Ikada, 2006; Estrada, Paz, & López, 2006; Garzón, 2006; Barrère & al., 2008; Meyer, Meyer, Handschel, & Wiesmann, 2009; Alvarez Barreto, 2009; Velasco Peña & Garzón Alvarado, 2010; Roa Ramirez & Quintian Ayala, 2016; Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular., s.f.):

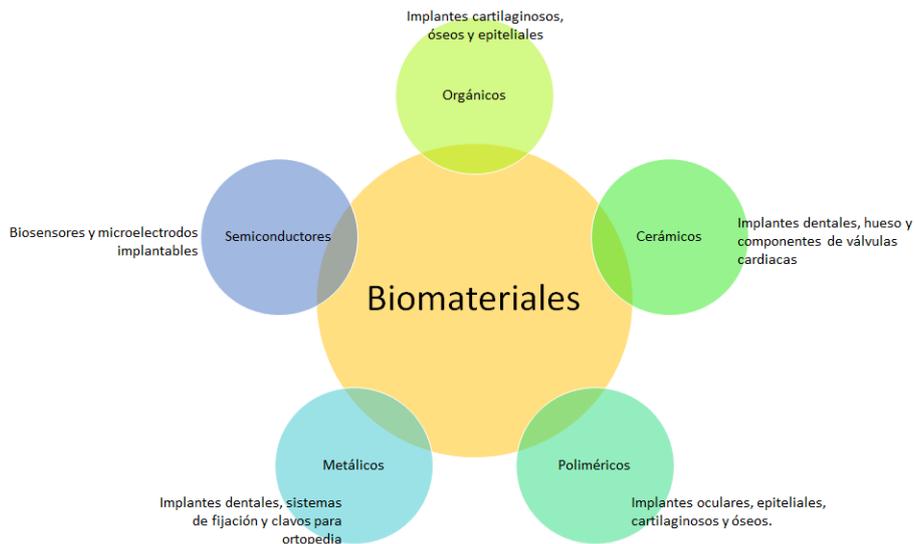
- **Biocompatibilidad:** Permite la integración adecuada al tejido del hospedero sin presentar efectos citotóxicos, genotóxicos o respuesta inmune
- **Biodegradabilidad:** Se refiere a la capacidad de descomposición y resorción del andamio mediante hidrólisis. La masa del andamio debe disminuirse por acción del organismo, la meta es no tener un implante al final del proceso, sino un tejido nativo nuevo.
- **Bioactividad:** Es la cualidad de promover interacción con los tejidos del huésped
- **Porosidad:** Deben tener poros abiertos e interconectados, necesarios para la difusión de nutrientes y gases y para la remoción de desechos metabólicos como resultado de la actividad celular. El tamaño ideal del poro para la ITO varía entre 200 y 900  $\mu\text{m}$ .
- **Propiedades químicas y topográficas:** Pueden afectar la adhesión celular y a la migración celular.
- **Propiedades mecánicas:** Depende del lugar de implantación y de las fuerzas mecánicas a las que se verá expuesto el implante. Las propiedades mecánicas como el módulo de elasticidad, la resistencia a la tracción, a la fractura, a la fatiga y porcentaje de elongación, entre otros, deben ser lo más cercanas posibles a las del tejido que se reemplaza.

### 2.1.2.3.1 Biomateriales

Un biomaterial se define como: "un material ideado para interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o substituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo" (Second Consensus Conference on definitions in Biomaterials, 1992).

La ingeniería de tejidos estudia las propiedades físicas y biológicas así como las aplicaciones de materiales sintéticos o naturales que son usados para estar en contacto con sistemas biológicos. Estos materiales, denominados biomateriales, son especialmente usados en aplicaciones médicas, aunque su uso se ha extendido a aplicaciones biológicas y de diagnóstico en laboratorio clínico (González Fernández, 2014; McDermott & Amis, 1990). La variedad de materiales utilizados en ingeniería de tejidos aumenta de día en día para mejorar la regeneración y recuperación del tejido *in vivo* y durante el cultivo *in vitro*.

La clasificación de los biomateriales depende de su comportamiento o de su naturaleza química, aunque en el diseño final pueden combinarse varias categorías (Figura 3) (Lizarbe, 2007; Binyamin, Shafi, & Mery, 2006; Williams, 1999).



**Figura 3: Clasificación y aplicaciones de los biomateriales, basado en Lizarbe, 2007 y Velasco Peña & Garzón Alvarado, 2010.**

### 2.1.2.3.1.1 Orgánicos

Los biomateriales orgánicos son los utilizados en los autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos. Su inconveniente radica en el costo y complejidad de los procedimientos quirúrgicos requeridos para obtener el tejido como implante, además de las complicaciones postoperatorias propias de cirugías invasivas. Los aloinjertos requieren de tratamientos como liofilización, irradiación, lavado con ácidos, entre otros para evitar el rechazo por parte del receptor y eliminar posibles infecciones en el tejido a implantar. Los xenoinjertos, también presentan el inconveniente de enfermedades contagiosas (Velasco Peña & Garzón Alvarado, 2010).

Existen algunas proteínas procedentes del tejido conjuntivo; que en el organismo forma los tendones, los huesos, la piel, los ligamentos y diversas membranas; capaces de ser utilizadas como biomateriales (Tabla 5) (Lizarbe, 2007).

**Tabla 5: Proteínas usadas como biomateriales, basado en Colorado, Agueldo, & Moncada, 2013; MacNeil, 2008; Auger, y otros, 1998; Kon'kov, Pustovalova, & I., 2010 y Boucard, y otros, 2007**

<b>Colágeno</b>	Utilizado en diversas formas para aplicación en ingeniería de tejido ya que permiten un fuerte anclaje celular, tiene un excelente potencial de vascularización. Su uso se ha extendido a la producción de otros tejidos, como vasos sanguíneos, ligamentos y bronquios.
<b>Fibroína</b>	Seda de origen natural altamente biocompatible que se biodegrada lentamente. La seda fibroína se utiliza para apoyar la adhesión de las células madre, la proliferación y diferenciación in vitro y para promover la reparación de una amplia gama de tejidos in vivo como cartílagos artificiales, fragmentos de tejido óseo, vasos sanguíneos, tejido epitelial y tejido nervioso óseos .
<b>Quitosano</b>	Polisacárido lineal cuyas propiedades le permiten aplicaciones en encapsulación de células, transporte de principios activos a través de las superficies epiteliales, cultivo celular, reparación de cartílago y reconstrucción de huesos.

### 2.1.2.3.1.2 Cerámicos

Incluye carbones, utilizados para implantes vasculares, cerámicas porosas, pero de baja resistencia mecánica, cerámicas de superficie bioactiva o reactiva, utilizadas

frecuentemente para la preparación de implantes que induzcan y posibiliten la formación de estructuras óseas, y sus mezclas (Lizarbe, 2007).

#### *2.1.2.3.1.3 Poliméricos*

Las propiedades físicas y estabilidad química de este grupo de biomateriales, dependen de un conjunto de variables tales como la composición química del polímero y de su grado de entrecruzamiento. Una de las ventajas que presentan es que se les puede dotar de una amplia variedad de propiedades por introducción de aditivos químicos, macromoléculas o segundas fases. Los biomateriales poliméricos pueden dividirse en tres grandes grupos, los elastómeros; altamente flexibles, los plásticos, de estructura es más rígida y de comportamiento térmicos variado; y los hidrogeles, una mezcla de los dos grupos anteriores con gran afinidad al agua (Lizarbe, 2007)

#### *2.1.2.3.1.4 Metálicos*

Los metales han sido muy utilizados como biomateriales con dos propósitos: fabricación de prótesis para reemplazar una parte del cuerpo o implantes utilizados en la estabilización y ayuda al proceso normal de reparación de un tejido. Entre los metales más utilizados se encuentran diversas clases de aceros inoxidables, aleaciones metálicas de cobalto, cromo, molibdeno y níquel, titanio y distintas aleaciones a base de titanio, aluminio y vanadio (Lizarbe, 2007; Singh & Dahotre, 2007).

#### *2.1.2.3.1.5 Semiconductores*

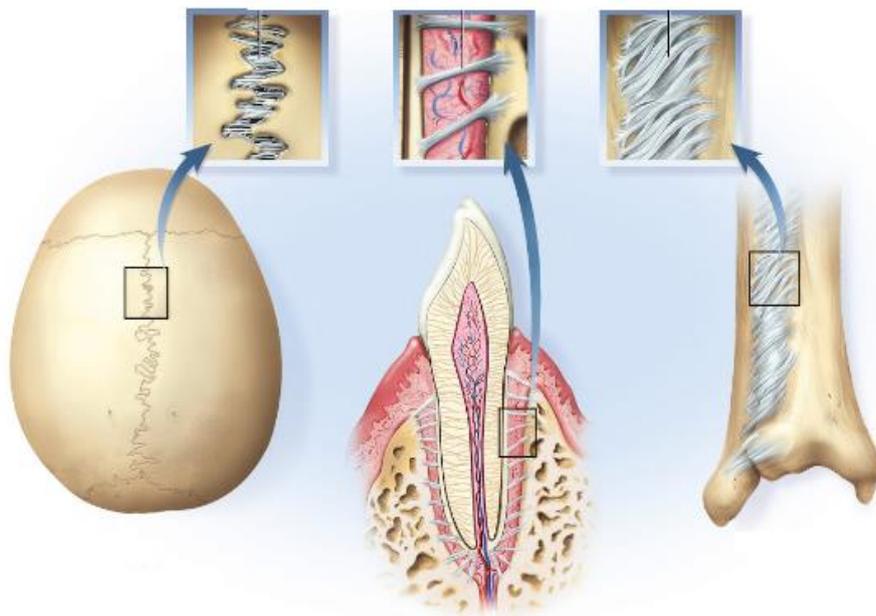
Es el grupo menos extendido de los biomateriales, se encuentran en desarrollo y son utilizados en el diseño de aquellos implantes que requieren de biosensores (Lizarbe, 2007).

### *2.2 Articulaciones*

Las articulaciones son aquellos puntos donde confluyen dos huesos, sin importar que puedan moverse o no; estos puntos hacen del sistema óseo en un todo funcional.

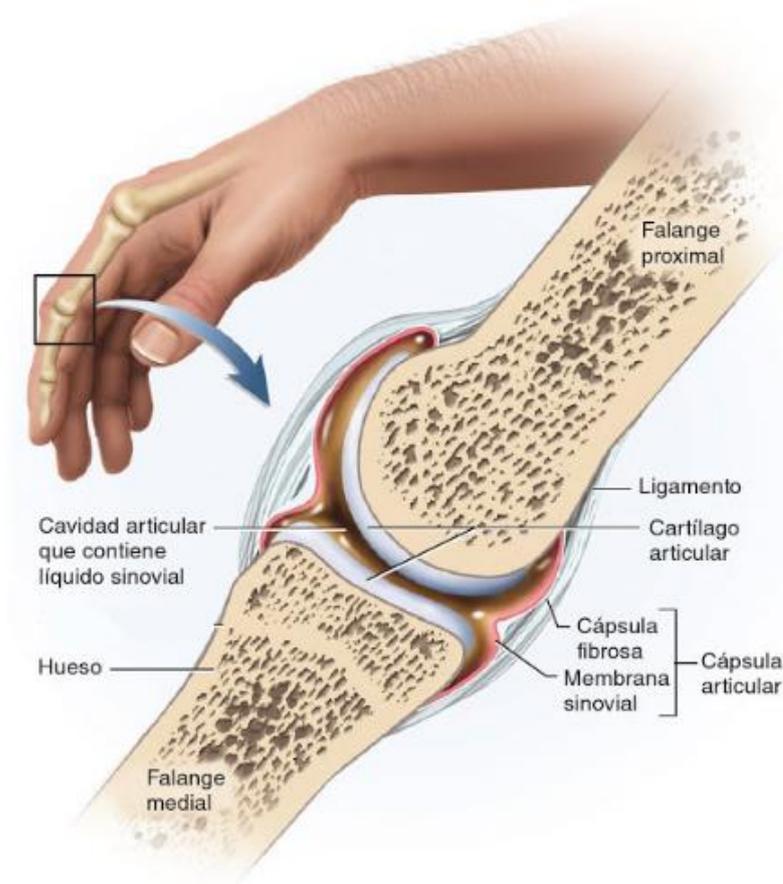
Las articulaciones se clasifican de acuerdo a la manera en que los huesos se unen entre sí (Saladin):

- Articulaciones óseas (sinostosis): Carecen de movimiento, se forman cuando la separación entre dos huesos se osifica. Pueden formarse por la osificación de articulaciones fibrosas o cartilaginosas.
- Articulaciones fibrosas (sinartrosis o articulación sinartrodial): Es un punto en que los huesos adyacentes están unidos por fibras de colágeno que surgen de un hueso (Figura 4).



**Figura 4: Saladin, K. (s.f.) Articulaciones fibrosas.**

- Articulaciones cartilaginosas (anfiartrosis o articulación anfiartrodial): Los dos huesos están unidos por cartílago hialino o fibrocartílago.
- Articulaciones sinoviales (diartrosis o articulación diartrodial): Es el tipo más familiar de articulación, poseen una estructura compleja con mayor posibilidad de desarrollar disfunciones (Figura 5).



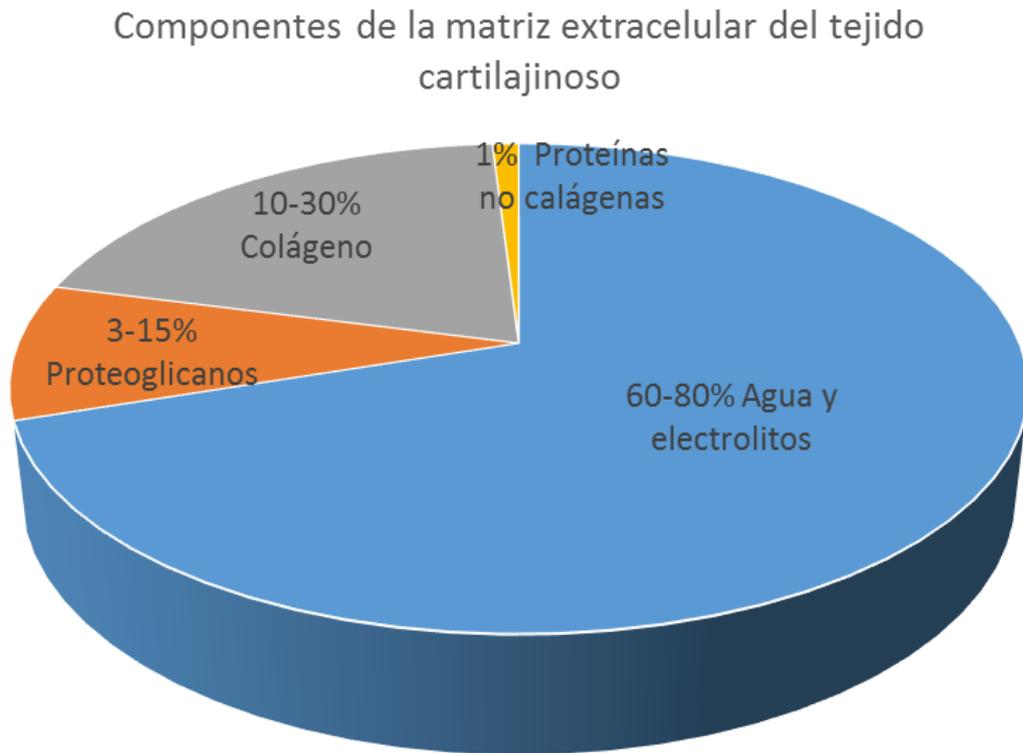
**Figura 5: Sladin, K. (s.f.) Estructura de una articulación sinovial simple.**

### *2.2.1.1 Tejido cartilaginoso*

El tejido cartilaginoso es un tejido muy abundante en los vertebrados, se caracteriza por ser un tejido conjuntivo, avascular, alinfático y sin inervación. Este tejido tiene varias funciones fundamentales en el organismo, tales como actuar de molde para el crecimiento y desarrollo de huesos largos, formar parte del esqueleto fetal, está presente en las superficies articulares de los huesos proporcionando movimientos de baja fricción y actúa también como soporte en algunos órganos del cuerpo (González Fernández, 2014; Antunes Colaço, 2008).

Los componentes de este tejido comprenden entre un 65-80% de agua y una serie de tipos celulares, en una proporción del 1-2% del volumen total (condroblastos, condrocitos, condroclastos y fibrocondrocitos) incluidos en una matriz, que representa entre el 70- 80% del peso total (Figura 6) (Stockwell, 1967) (González Fernández,

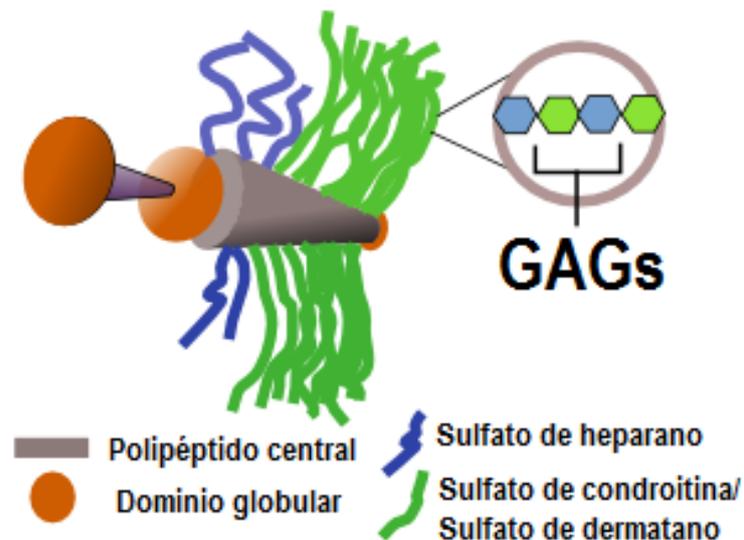
2014). Los condrocitos secretan continuamente moléculas extracelulares incluyendo colágena, glicosaminoglicanos (GAGs) y elastina; las cuales se relacionan con las características biomecánicas del tejido (Raya Rivera , Esquiliano Rendón, & González Pérez).



**Figura 6:** Componentes de la matriz extracelular del tejido cartilajinoso. El grupo del colágeno, esta principalmente formado por colágeno tipo II. Los proteoglicanos (PGs) están conformados por glicosaminoglicanos (GAGs), como sulfato de dermatano, sulfato de condroitina, sulfato de heparano, queratosulfato y ácido hialurónico, que provee viscosidad al tejido; unidos covalentemente. Entre las proteínas no colágenas podemos encontrar fibras elásticas y reticulares, fibronectina, laminina, tenascina, trombospondinas y la proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa. Basado en Raya Rivera, Esquiliano Rendón, & González Pérez; González Fernández, 2014; Alberts, y otros, 1989; Stockwell, 1967; Moreland, 2003 y Buckwalter & Rosenberg, 1988.

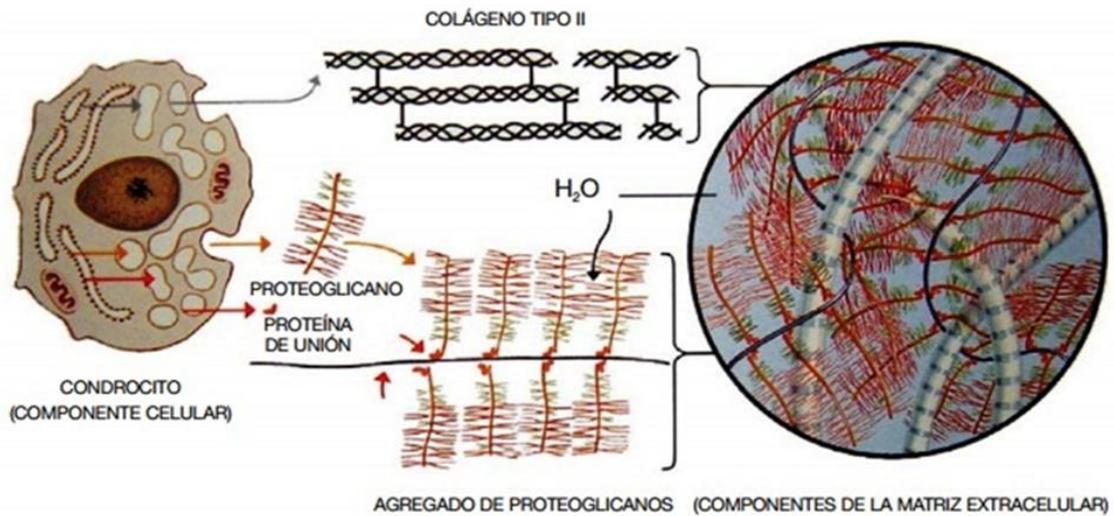
La fase acuosa de la matriz extracelular del cartílago permite la difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas entre sangre y tejidos. Las fibras de proteína no colágena brindan elasticidad y resistencia a la tensión. Las largas fibras de colágeno refuerzan y contribuyen a organizar la matriz; estas se encuentran estructuradas en forma helicoidal de 3 hebras (Raya Rivera , Esquiliano Rendón, & González Pérez).

Los proteoglicanos responsables de la resistencia a la compresión del cartílago, son macromoléculas compuestas que están constituidas por un filamento proteico central al cual se unen, por medio de los enlaces covalentes, una serie variable de cadenas lineales de GAGs y oligosacáridos. La molécula típica es el agrecano, en su forma completa, la porción proteica de la molécula posee tres dominios globulares (G1, G2, G3), que están separados por dos dominios lineales. El dominio globular G1, al lado del extremo N-terminal, posee una fuerte afinidad por el ácido hialurónico y ciertas glicoproteínas. El dominio G2 no posee afinidad con el ácido hialurónico y las proteínas de unión, aunque su estructura se asemeja a la del dominio G1. En su posición C-terminal se encuentra el dominio globular G3 (Figura 7) (Raya Rivera , Esquiliano Rendón, & González Pérez).



**Figura 7: Lamoreux (2007). Esquema del agrecano.**

Los proteoglicanos (PGs), debido a su carga negativa, atraen cationes de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y moléculas de agua, hidratando la matriz del cartílago hasta un 80%, confiriendo la resistencia característica frente a las fuerzas de compresión. Además, las cadenas laterales de GAGs forman enlaces electrostáticos con el colágeno, de esta forma, la sustancia básica y las fibras de la matriz forman una estructura molecular cruzada resistente a las fuerzas de tensión. Los GAGs son largas cadenas de polisacáridos no ramificadas, compuestas por unidades repetidas de disacáridos, estos tienen una intensa carga negativa debido a la presencia en muchos de los residuos de azúcar de grupos carboxilo (Figura 8) (Raya Rivera , Esquiliano Rendón, & González Pérez)



**Figura 8: Buckwalter, J. A. (1995) El colágeno y los PGs interactúan conformando la matriz extracelular del cartílago, capaz de retener grandes cantidades de agua.**

La matriz extracelular del cartílago presenta variaciones de composición en los estratos de cartílago articular: en el superficial hay escasos PGs debido a que sufren una degradación más rápida y se sintetizan en menor cantidad, poco colágeno y la mayor concentración de fibronectina y agua; en el de transición hay una concentración superior de PGs y menor de agua; en el medio o radial se encuentran las fibras de colágeno de mayor diámetro, la concentración de PG es la más elevada y la de agua la menor; finalmente, en el estrato de cartílago calcificado la matriz extracelular se encuentra calcificada (Poole, y otros, 2001; Buckwalter & Mankin, 1998; Vega Álvarez, García-Suárez, Fernández Monjil, & Del Valle Soto, 2016). Por otro lado, la zona pericelular está constituida fundamentalmente por PG sulfatados, biglicanos, hialuronato, glicoproteínas y moléculas de adhesión tales como fibronectina y laminina; así como colágeno de tipo VI. La matriz territorial posee una alta concentración de PG ricos en sulfato de condroitina. Por último, la matriz interterritorial se caracteriza por su alta concentración en PG ricos en queratosulfato (Figura 9) (Vega Álvarez, García-Suárez, Fernández Monjil, & Del Valle Soto, 2016)

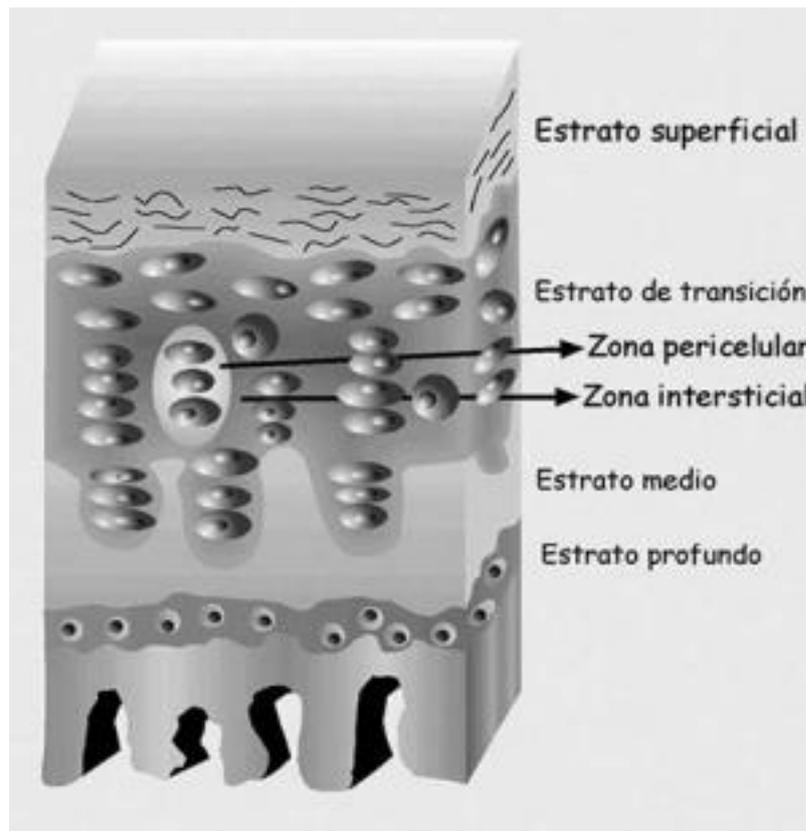


Figura 9: Vega, Á. et al (2016) Esquema de los estratos y zonas del tejido cartilaginoso.

Según su histología, el cartilago se clasifica en tres grandes grupos (Tabla 6).

Tabla 6: Clasificación de los tejidos cartilagosos. Basado en H. Ross & Pawlina, 2008 y Raya Rivera , Esquiliano Rendón, & González Pérez.

	Cartílago hialino	Cartílago elástico	Cartílago fibroso
Ubicación	Recubre la superficie articular de los huesos largos y la extremidad ventral de las costillas	Pabellón de la oreja, el conducto auditivo externo, la trompa de Eustaquio y la laringe	Hace parte de los discos intervertebrales y de la inserción de tendones o ligamentos en los huesos
Capacidades	Resistente a la compresión, provee amortiguación y permite movimiento por su baja fricción	Provee sostén elástico	Resiste fuerzas de deformación externa
Tipos celulares	Condroblastos, condrocitos	Condroblastos, condrocitos	Condrocitos, fibroblastos
Componentes de la matriz extracelular	Colágeno tipo II, agregano	Colágeno tipo II, fibras elásticas, agregano	Colágeno I y II, versicano

### 2.2.1.1.1. Las células del tejido cartilaginoso

Durante el periodo de desarrollo embrionario el esqueleto es sobretodo cartilaginoso, siendo gradualmente sustituido por tejido óseo. La histogénesis del cartílago es un proceso complejo, que se inicia mediante interacciones epitelio-mesenquimatosas. Existen dos tipos fundamentales de tejidos embrionarios: el epitelial y el mesenquimatoso. Durante los estadios iniciales del proceso de diferenciación del embrión, el tejido epitelial puede transformarse en mesenquimatoso y viceversa, además de esta transformación, estos tejidos interactúan entre ellos, influenciando mutuamente su diferenciación (Antunes Colaço, 2008; Collins, 1995; Hickok, Hass, & Tuan, 1998). El tejido mesenquimatoso es la forma joven de tejido conjuntivo, que se caracteriza por estar constituido por células mesenquimatosas de forma estrellada, distribuidas en una matriz abundante (Figura 10) (Noden & Delahunta, 1990).

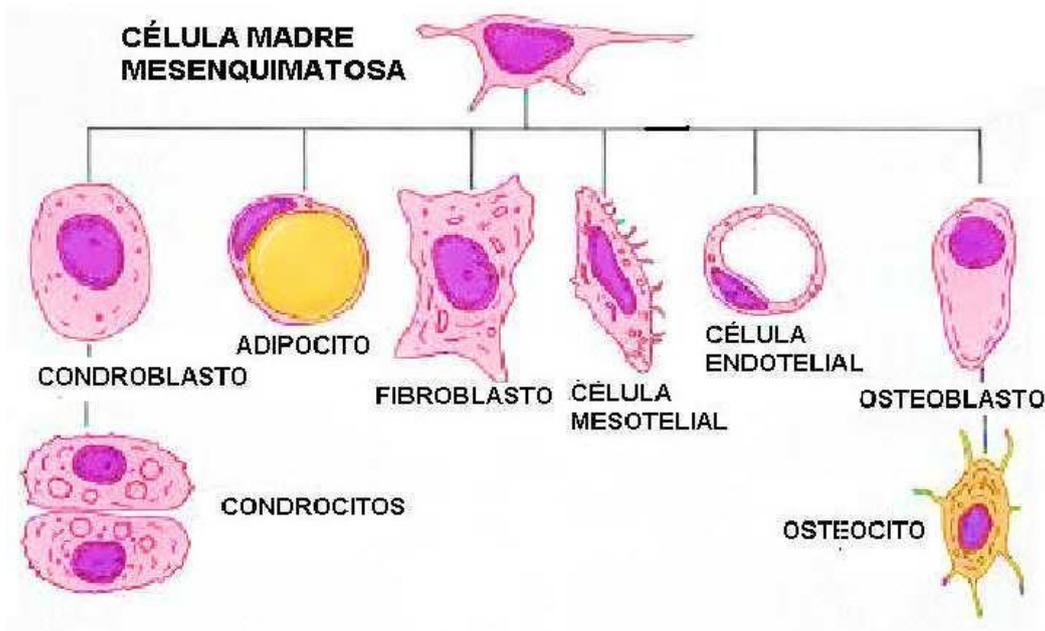
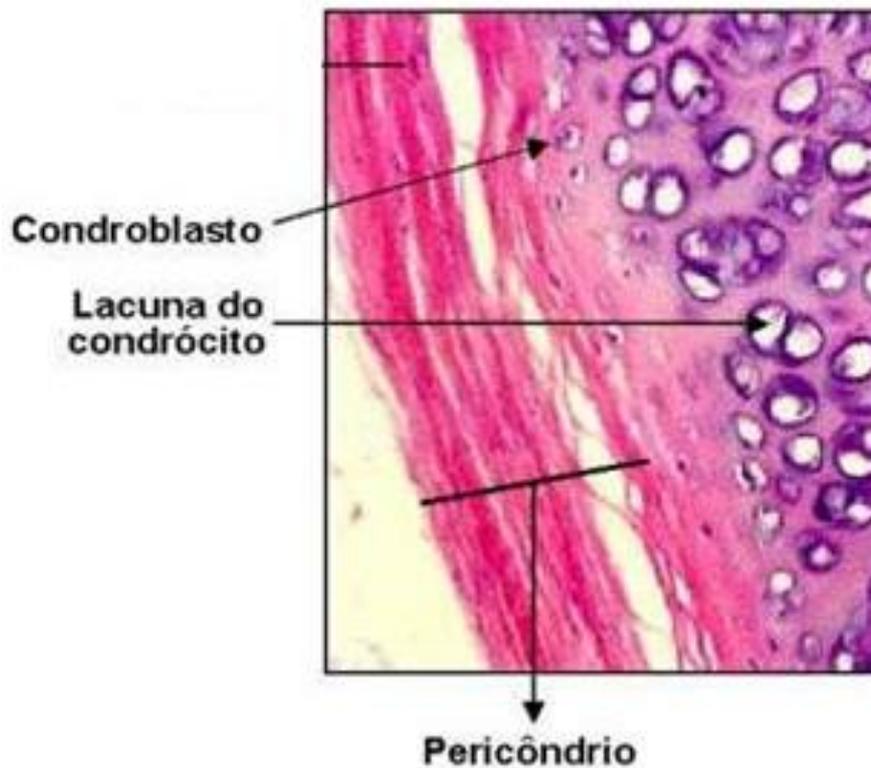


Figura 10: Safonts, C. (2015) Histogénesis del cartílago

#### 2.2.1.1.1.1 Condroblastos

Los condroblastos son células precursoras presentes en los lugares de formación inicial del cartílago, o centros condrogénicos del embrión y se mantienen en el adulto en el pericondrio, una capa de tejido conjuntivo que cubre el cartílago hialino (Murillo García, 2015). Los condroblastos forman a su alrededor un halo de matriz basófila adyacente, compuesta por una red de fibras de colágeno de los tipos II, IX y de

proteoglicanos. Estas células tienen un aspecto ovalado con un núcleo esférico, un citoplasma basófilo (debido a la presencia en gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso (RER)) y un complejo aparato de Golgi, teniendo un papel fundamental en el crecimiento cartilaginoso (Figura 11) (Antunes Colaço, 2008; Eurell & Sickle, 1998; Junqueira, Carneiro, & Kelley, 1998).



**Figura 11:** Caseres, C. (2011). Pericóndrio, condroblastos y condrocitos.

#### *2.2.1.1.1.2 Condrocitos*

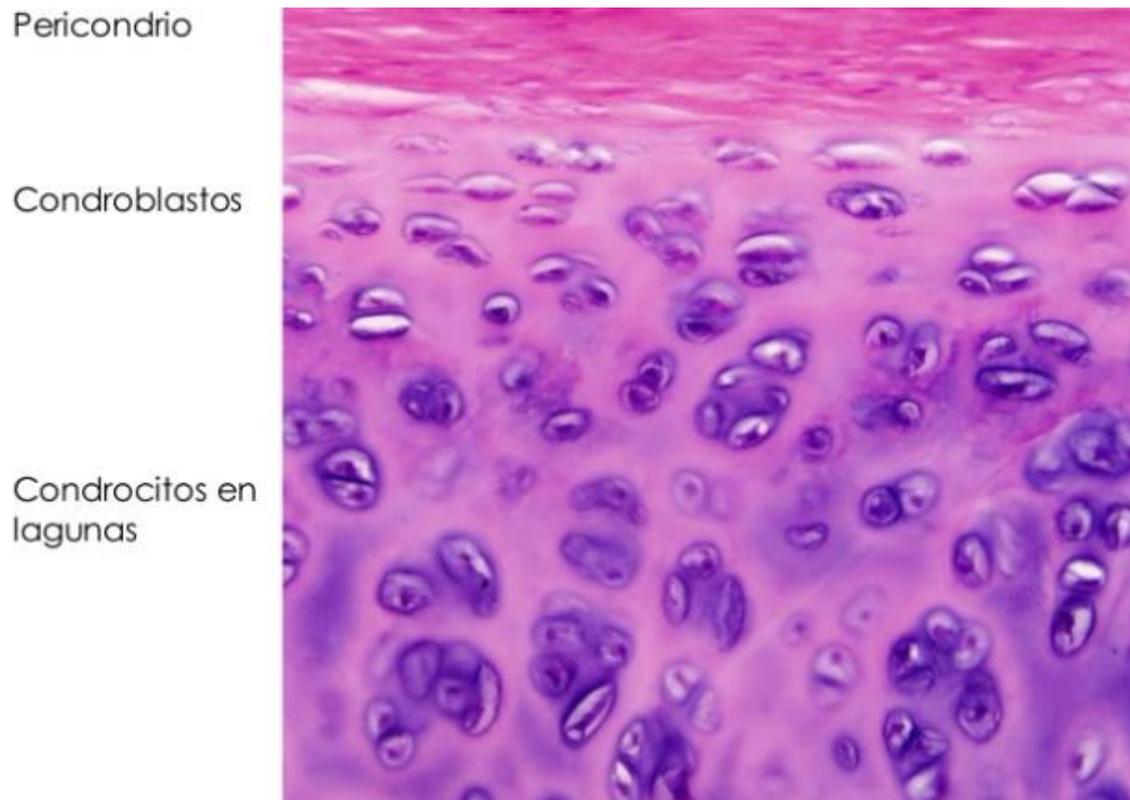
El condrocito es la célula por excelencia del cartílago (Figura 12). Los condrocitos tienen las mismas funciones que los condroblastos, pero con un nivel de actividad más reducido. Los condrocitos son consideradas células menos activas que los condroblastos, siendo estos últimos responsables del mantenimiento de la matriz que los rodea, sintetizando colágeno, principalmente del tipo II, glicoproteínas, proteoglicanos y ácido hialurónico, quedando incluidos en cavidades de la matriz denominadas lagunas. (Antunes Colaço, 2008)



**Figura 12: Kühnel, W (2003). Condrocitos del cartílago hialino de la tráquea con inclusiones lipídicas almacenadas en el citoplasma, el cual contiene mitocondrias pequeñas, partículas de glucógeno y haces de filamentos. La cápsula del condrocito está formada por matriz extracelular.**

Los condrocitos son células redondas o poligonales de alrededor de 5 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro (Errington, Fricker, Wood, Hall, & White, 1997; Sánchez Naranjo, 2008), con un núcleo esférico y con uno o más nucléolos. Debido a su gran función anabólica poseen un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollado, mitocondrias poco abundantes y un aparato de Golgi complejo y prominente (Eurell & Sickle, 1998; Goldring, 2006).

Su morfología varía dependiendo de la zona del cartílago de la cual se aíslan: en las capas más superficiales tienden a ser elípticos, mientras que en las capas más profundas van adquiriendo una forma más esférica. Tienen capacidad de deformación adaptativa en respuesta a fuerzas mecánicas (Ghadially, Lalonde, & Wedge, 1983). Están usualmente agrupados en las denominadas lagunas, pero no se han demostrado conexiones entre ellos; es decir, cada célula está completamente rodeada de matriz extracelular, en íntima relación con ésta (Figura 13) (Schmal, y otros, 2006). Este hecho facilita la suplencia de oxígeno y nutrientes, la cual debe realizarse por difusión a través de la matriz, puesto que el cartílago es un tejido avascular (Wilkins, Browning, & Ellory, 2000). Esto también significa que los condrocitos están expuestos a una baja presión parcial de oxígeno constante (10% en la superficie y 1 % en las capas más profundas) (Archer & Francis-West, 2003).



**Figura 13: Serrano, A (2015). Condrocitos en lagunas, condroblastos y pericondrio.**

La carga mecánica tiene efectos de tipo dinámico y de tipo estático (Browning, Saunders, Urban, & Wilkins, 2004) (Urban, 1994). Los de tipo dinámico incluyen los cambios en la presión hidrostática, generados por la disminución de la cantidad de agua presente en el tejido inducida por la carga, y la deformación del cartílago consecuencia directa de los cambios de presión mecánica, los cuales pueden inducir cambios en la tensión de la membrana del condrocito, que a su vez puede afectar una multitud de mecanismos de transporte, los cuales pueden afectar el metabolismo de la matriz (Elder SH, 2006). Desde el punto de vista estático, el movimiento de agua genera cambios en la osmolaridad local, lo cual afecta el equilibrio osmótico entre el condrocito y su medio extracelular, efecto que induce cambios en los mecanismos de transporte de membrana para poder compensar los flujos de agua que en otro caso alterarían significativamente el volumen intracelular (Sánchez Naranjo, 2008).

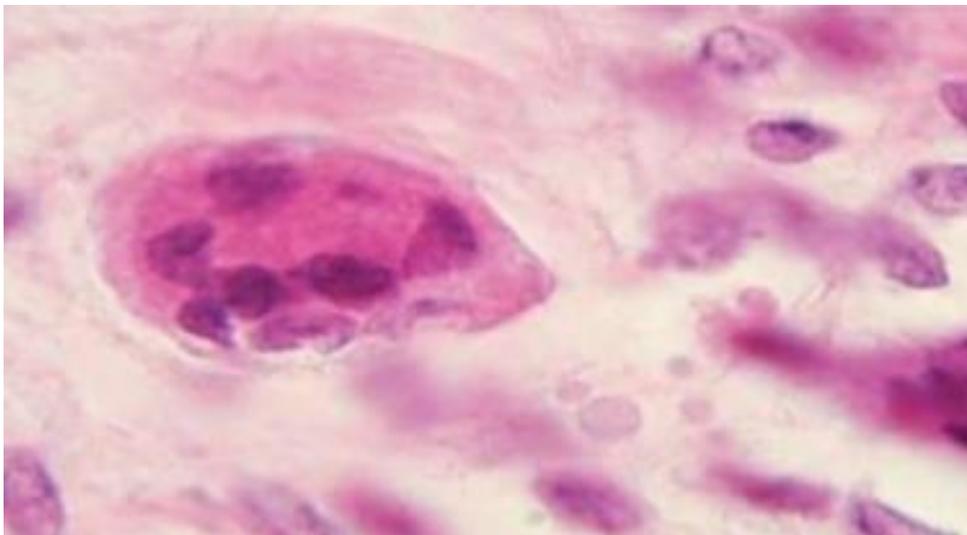
Los condrocitos son células altamente glicolíticas, metabolizan la glucosa principalmente por glicólisis anaeróbica, lo que presenta efectos Pasteur negativos; requiriendo un aporte regular de glucosa para una óptima producción de ATP en la homeostasis celular (Lee & Urban, 1997). De esta forma, la glucosa es un importante metabolito y un importante precursor estructural fundamental para el cartílago, de modo

que su transporte tiene consecuencias significativas en el desarrollo cartilaginoso y su integridad funcional (Antunes Colaço, 2008).

Los condrocitos maduros y diferenciados son la primera elección para la regeneración cartilaginosa por ser la población celular nativa del cartílago y sintetizar los componentes propios de la matriz (Freed, y otros, 1998). Los condrocitos se aíslan fácilmente, pero es complicado obtener un número apropiado de células con capacidad para regenerar el cartílago completo (Huckle, Dootson, & Medcalf, 2003) y cuando se cultivan sobre superficies plásticas, pueden desdiferenciarse en células de tipo fibroblástico (González Fernández, 2014).

#### *2.2.1.1.1.3 Condroclastos*

Los condroclastos están presentes especialmente durante los estadios de desarrollo. Esta célula gigante multinucleada, que resulta de la fusión de macrófagos, es responsable de la renovación de la matriz cartilaginosa y de las células (Nordahl, Andersson, & Reinholt, 1998). Estas células se reconocen fácilmente por sus numerosas mitocondrias y vacuolas (Figura 14) (Takuma, 1962; Banks, 1992)

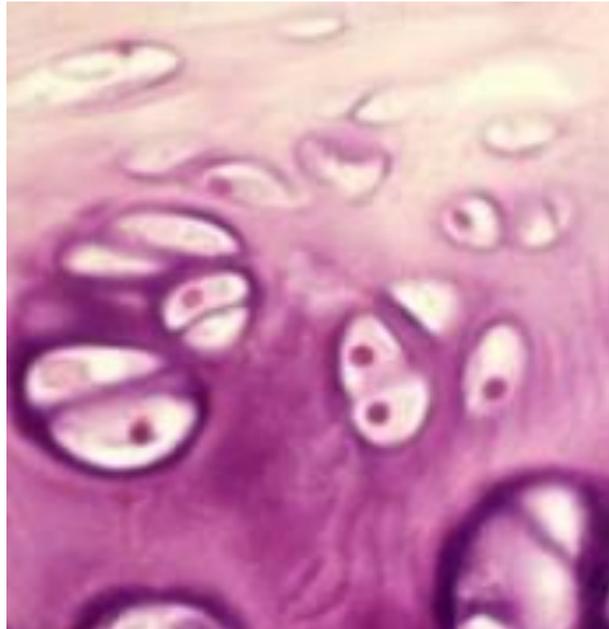


**Figura 14: Zapata, J. (2014) Condroclasto.**

#### *2.2.1.1.1.4 Fibrocondrocitos*

Son considerados como una combinación entre los condrocitos y los fibroblastos (Sweigart, AufderHeide, & Athanasiou, 2003). Estas células presentan una morfología

redonda y están protegidos por una matriz territorial, como los condrocitos, pero producen colágeno tipo I como los fibroblastos (Benjamin & J.R., 2004). Existen dos poblaciones morfológicamente distintas de fibrocondrocitos: una de células ovas o fusiformes con pocas prolongaciones celulares situada en la capa más superficial, y otra con células redondas o poligonales, con más prolongaciones y localizada en las capas más profundas (Figura 15) (Ghadially, Lalonde, & Wedge, 1983).



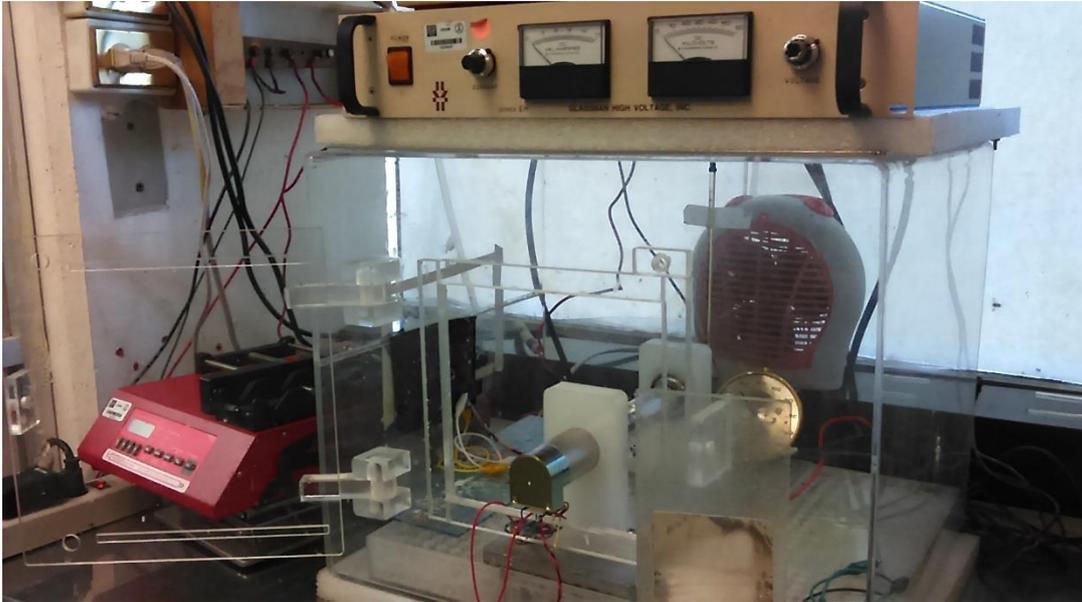
**Figura 15: Martínez, C. (2007) Fibrocondrocito.**

### *2.3 Generación del andamio para reemplazo de cartílago*

#### *2.3.1 Técnica de electrohilado o electrospinning para la síntesis de los andamios de PCL-PLA*

La técnica de electrohilado o electrospinning consiste en generar micro y nanofibras empleando fuerzas eléctricas variables (Doshi, 1995; Gamboa, Mantilla, & V., 2007) (Figura 16). Estas fibras transfieren al andamio características únicas, entre las que se encuentra: un área superficial muy grande en relación al volumen (Tong, Zhang, & Wang, 2012) (en el caso de las nanofibras, esta relación puede ser un aproximado de 10<sup>3</sup> veces más que una microfibras) (Huang, Zhang, Kotaki, & Ramakrishna, 2003), flexibilidad en la superficie, alta porosidad (Li, Caterson, Tuan, & Ko, 2002; Li, Vepari, Jin, Kim, & Kaplan, 2006), poros interconectados (Jiang, y otros, 2005) y un alto rendimiento mecánico (Duque Sánchez, Rodríguez, & Marcos, 2013).

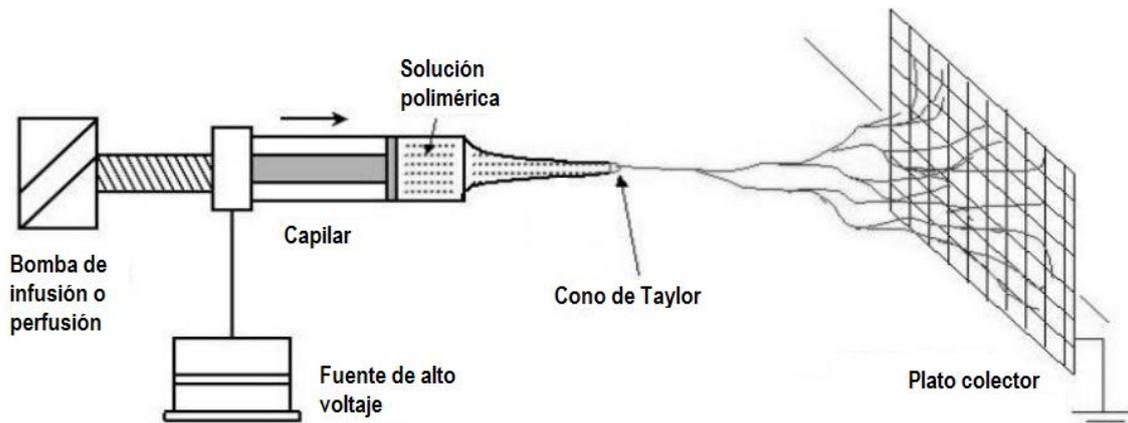
La técnica de electrohilado permite encapsular o atrapar materiales en las fibras matrices; puede encapsular proteínas y células. (Gamboa, Mantilla, & V., 2007).



**Figura 16: Equipo de electrohilado en el "Instituto de Investigaciones en Materiales" de la "Universidad Nacional Autónoma de México"**

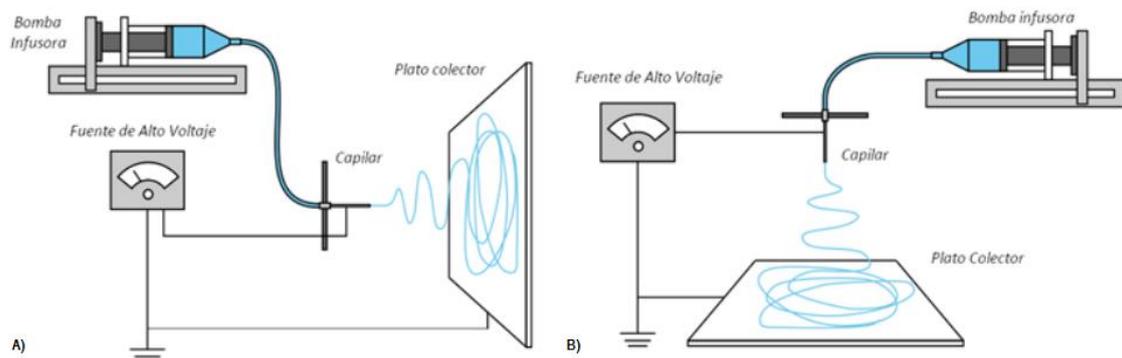
El electrohilado consiste en hacer girar soluciones de polímero a través de altos campos eléctricos, se basa en aplicar suficientes fuerzas eléctricas que superen las fuerzas de la tensión superficial en la solución de polímero cargado, de esta forma a un voltaje determinado, finos chorros de solución son expulsados desde el capilar hasta el plato colector. Posteriormente el chorro se mueve en la dirección del campo eléctrico, el disolvente se evapora y los segmentos de fibras son depositados al azar en un plato colector. (Chew, Wen, Dzenis, & Leong, 2006).

El típico montaje para la ejecución de la técnica de electrospinning consta de un capilar a través del cual debe ser expulsada la solución polimérica; una fuente de alto voltaje que posee dos electrodos los cuales deben conectarse uno al lugar de salida de la solución (capilar) y otro directamente al plato colector (pantalla metálica) (Figura 17) (Huang, Zhang, Kotaki, & Ramakrishna, 2003; Sill & Von Recum, 2008; Fang, Niu, Lin, & Wang, 2008). El producto obtenido es una manta de fibra no-tejida compuesta de fibras con diámetros entre 50nm y 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 17: Gamboa, W. (2016) Esquema básico de la técnica de electrohilado.**

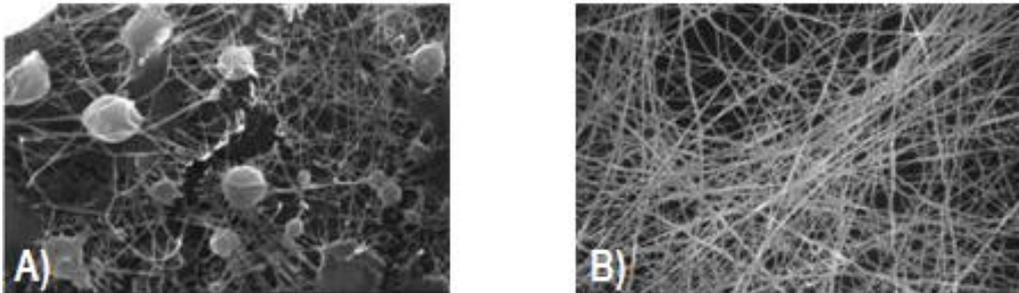
La técnica puede ser desarrollada de forma horizontal o vertical según se desee (Figura 18), el principal inconveniente al trabajar en posición vertical es la posible salida de gotas de solución desde el capilar hacia el plato colector las cuales pueden caer sobre las fibras depositadas haciendo defectuosa la superficie de las mismas e interrumpiendo el proceso (Duque Sámchez, Rodríguez, & Marcos, 2013; Gamboa, Mantilla, & V., 2007).



**Figura 18: Duque, L. (2013) A) Configuración horizontal para un sistema de electrohilado B) Configuración vertical para la técnica de electrohilado**

Para el inicio del proceso, el polímero debe estar diluido completamente con el fin de evitar taponamiento del capilar y para promover la obtención de fibras homogéneas (sin beads) (Figura 19). La solución debe ser dielectrica para cambiar su posición ligeramente en respuesta al campo eléctrico externo, lo que explica por qué ocurre el estiramiento de la solución en el proceso. Una vez que se tiene la solución dentro del capilar y se inicia la aplicación de alto voltaje, las cargas se acumulan promoviendo la formación de una gota en la punta del capilar, a medida que la intensidad del campo eléctrico se incrementa, la gota se alarga para crear una forma cónica conocida como cono de Taylor (Taylor, 1969; Ramakrishna, Fujihara, Teo, Lim, & Ma, 2005). La fuerza del campo eléctrico supera las fuerzas de cohesión de la solución, generando un chorro de solución de polímero desde la punta del capilar hasta el plato colector; en su viaje, el disolvente se evapora y finalmente, las fibras se solidifican a su

llegada al plato colector (Lannutti, Reneker, Ma, Tomasko, & Farson, 504). Luego de ser extraídas del plato colector algunos autores sugieren mantener las fibras en vacío para eliminar el disolvente remanente (Jiang, y otros, 2005; Zhao P, 2007; Ravichandran, y otros, 2012; Duque Sánchez, Rodríguez, & Marcos, 2013)



**Figura 19:** Sugimoto Lab (2013). A) Polímero con beads, estos se forman por la presencia de solvente en las fibras del polímero y por el taponamiento del capilar.  
B) Polímero con fibras regulares.

### 2.3.2 Características de los polímeros

#### 2.3.2.1 Policaprolactona

La policaprolactona resulta de la incorporación de segmentos largos de unidades de caprolactona ( $\epsilon$ -caprolactona). La caprolactona es un polímero de alto peso molecular que presenta una temperatura de fusión de 61°C y por su baja temperatura de transición vítrea, -60°C, posee una gran capacidad para preparar polímeros y co-polímero con propiedades muy diferentes, desde sistemas rígidos a muy flexibles tipo elastómeros. En su forma como co-polímero con ácido láctico o ácido glicólico proporcionan un sensible aumento de la flexibilidad y de su capacidad para formar fibras de adhesión y proliferación celular (Raya Rivera , Esquiliano Rendón, & González Pérez).

#### 2.3.2.2 Ácido poli-láctico

La láctida es el dímero cíclico del ácido láctico, que existe en forma de dos isómeros ópticos, el D y el L. El monómero cíclico tiene dos carbonos asimétricos por lo que es factible preparar polímeros con diferentes tacticidades. La L-láctida es la que contiene el estereoisómero natural, mientras el D-lactida está formado por los dos estereoisómeros. El homopolímero derivado del monómero natural, L-láctico (L-PLA), tiene alta resistencia a la tensión y baja elongación, lo que hace al polímero muy adecuado para aplicaciones que tienen que soportar una carga como son las suturas y fijaciones ortopédicas. Térmicamente, se caracteriza por tener un punto de ebullición

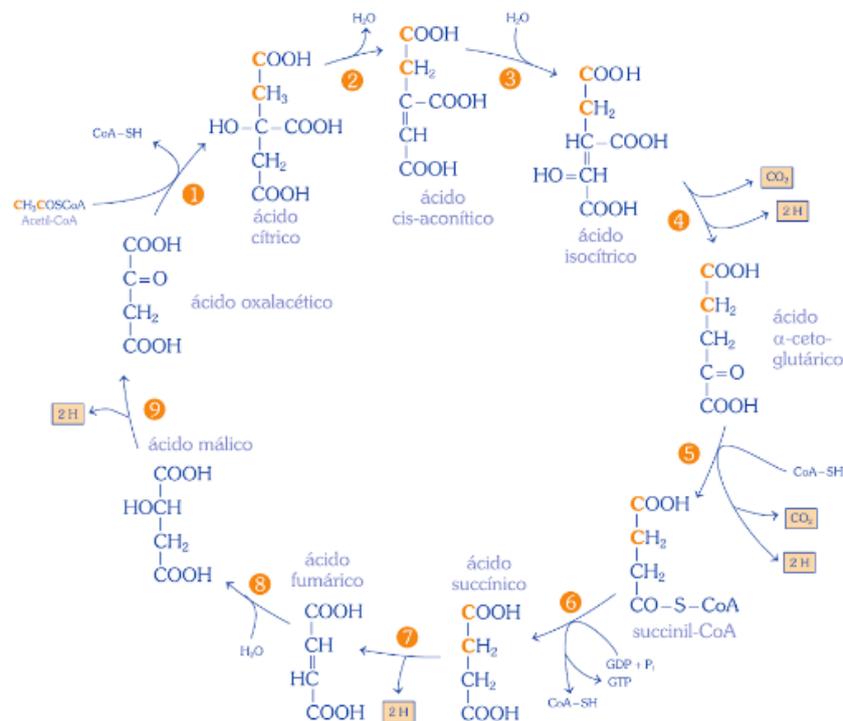
elevado (175-178°C) y una temperatura de transición vítrea comprendida entre 60-65°C (Raya Rivera , Esquiliano Rendón, & González Pérez).

## 2.4 Procedimientos a utilizar para la evaluación de viabilidad del polímero

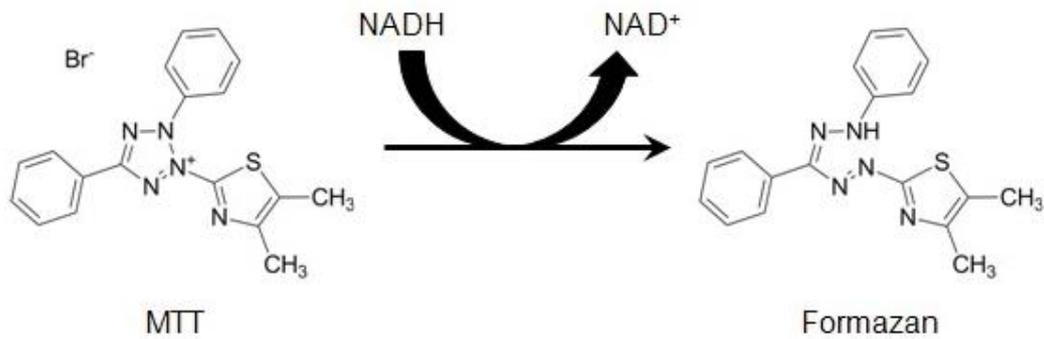
### 2.4.1 Viabilidad por MTT

La medición de la viabilidad y proliferación celular es la base de numerosos ensayos *in vitro*. La reducción de sales de tetrazolio es un método común para la medición de la proliferación celular (American Type Culture Collection).

El tetrazolio amarillo MTT Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol es un colorante amarillo pálido, soluble en agua (Escobar M., Rivera, & Aristizábal G., 2010) que se reduce por la actividad metabólica de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (Figura 20). El resultado de este ensayo es la generación de cristales de formazán púrpura insolubles en agua dentro de la célula (Figura 21) (Pontino, y otros, 2006). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (American Type Culture Collection; de Castro de Pardo, 2006).

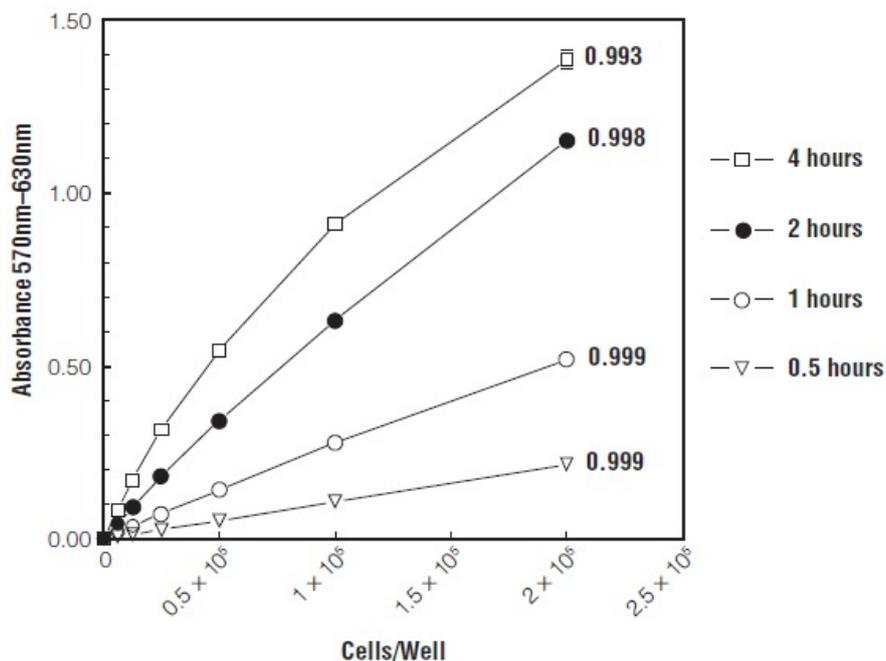


**Figura 20: Teijon, J. (2006) Reacciones del Ciclo de Krebs. (1) Citrato sintasa. (2) Aconitasa. (3) Aconitasa. (4) Isocitrato deshidrogenasa. (5) Complejo }-cetoglutarato deshidrogenasa. (6) }-cetoglutarato deshidrogenasa. (7) Succinil CoA sintetasa. (8) Succinato deshidrogenasa. (9) Fumarasa. (10) Malato deshidrogenasa. Los átomos del acetil-CoA aparecen en color naranja.**



**Figura 21:** Riss, T. (2016) Estructura del MTT y de formazán. El mecanismo exacto de la reducción del MTT a formazán incluye la reacción de NADH o moléculas reductoras similares que transfieren electrones al MTT.

El reactivo de MTT es preparado en solución fisiológica y es agregado al medio de cultivo, usualmente a una concentración de 0.2 - 0.5 mg/mL y es incubado entre 1 y 4 horas. El formazán presumiblemente proporcional al número de células viables es leído a una absorbancia de 540 nm. Una longitud de onda de 630 nm puede ser usada como referencia, pero su uso no es indispensable para la mayoría de ensayos, pues la lectura obtenida generalmente es despreciable (Figura 22) (Riss, y otros, 2013). Para poder llevar a cabo la lectura del formazán se utilizan diversos solventes que ayudan a estabilizar en color, evitar la evaporación y reducen la interferencia de rojo fenol y otros colorantes en los medios de cultivo (Tada, Shiho, Kuroshima, & al., 1986; Hansen, Nielsen, & Berg, 1989; Denizot & R., 1986). Algunos de estos solventes con alcohol ácido (isopropanol ácido), DMSO, dimetilformamida, SDS y combinaciones de detergentes y solventes orgánicos (Mosmann, 1983; Tada, Shiho, Kuroshima, & al., 1986; Hansen, Nielsen, & Berg, 1989; Denizot & R., 1986). La señal generada para la lectura depende de la concentración del MTT y el tiempo de incubación por lo que estos parámetros deben ser estandarizados (Riss, y otros, 2013).



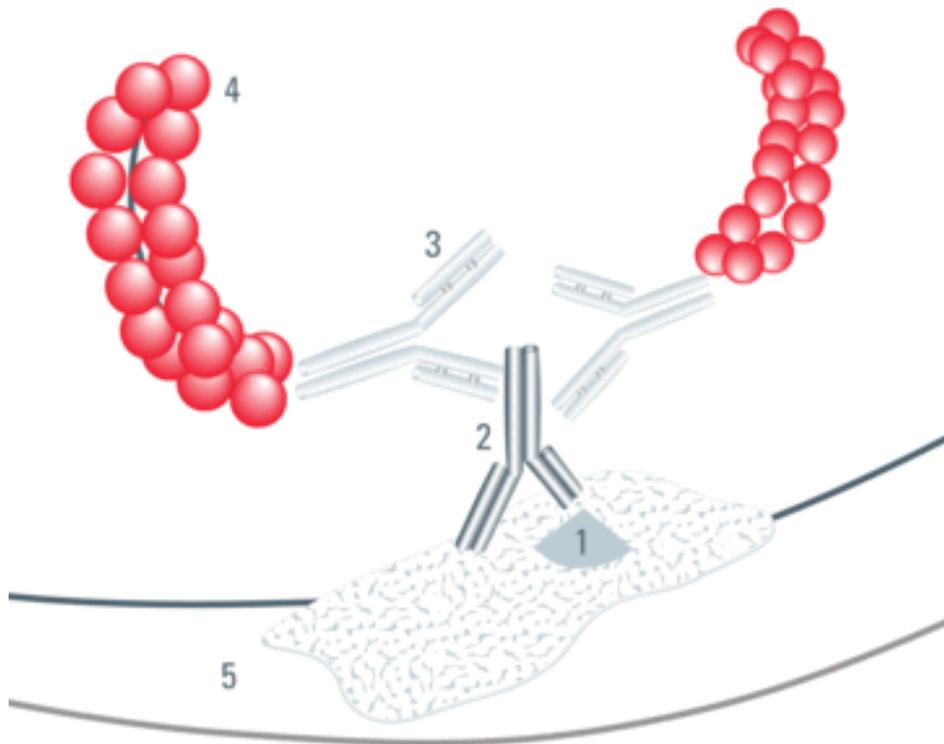
**Figura 22: Riss, T. (2016) Correlación directa entre el formazán y la absorbancia en un experimento de adaptación celular con hibridomas. Gracias numerosos estudios como este se ha concluido que a mayor tiempo de incubación mayor será la intensidad del color, lo que aumenta la sensibilidad del método, sin embargo, el tiempo de incubación está limitado por la naturaleza citotóxica del reactivo de detección.**

#### 2.4.2 Inmunohistoquímica

La Inmunohistoquímica es de vital importancia para el marcaje selectivo de proteínas y otros elementos que pueden estar presentes, tanto en las membranas celulares, citoplasma, y demás compartimientos citoplásmicos, así como también en la matriz extracelular. Es de gran utilidad en la identificación de las estirpes celulares de los tejidos básicos, de receptores de membranas, proteínas citosólicas, y de cualquier otra estructura para la cual se halla desarrollado un anticuerpo específico. Su aplicación es de indiscutible valor en anatomía patológica en el diagnóstico de lesiones tumorales y su pronóstico y en la investigación en general, sobre todo en la definición del inmunofenotipo de las células de los tejidos.

La técnica de Inmunohistoquímica se fundamenta en la reacción Antígeno – Anticuerpo (Lacave & Caballero, 2014). La reacción antígeno - anticuerpo en la técnica inmunohistoquímica es incolora y para hacerla evidente, se utilizan algunos métodos como la fluorescencia, las reacciones enzima-sustrato que convierte al cromógeno sin color en un compuesto coloreado que permite identificar el lugar donde se depositaron los anticuerpos utilizados (Universidad de los Andes, 2014).

Una inmunohistoquímica consiste en aplicar un anticuerpo fabricado para reconocer la proteína que buscamos. Enseguida se añade un segundo anticuerpo que reconoce al anticuerpo previamente colocado, este contiene un complejo de Avidina-Biotina. Finalmente, se emplea una reacción química que transforma una sustancia soluble e incolora en otra insoluble y de color marrón. Dicha sustancia es la diaminobencidina (DAB), que se añade como último paso. Allí donde encuentre complejo Avidina-Biotina, precipitará y dará color (Figura 23) (Borras Murcia, 2012).



**Figura 23: Borras, M (2012). Esquema de la técnica de inmunohistoquímica. El anticuerpo primario (2) se adhiere al antígeno buscado (1). Sobre él se añade un anticuerpo secundario (3) y, para agrandar toda la estructura, se añade un complejo Avidina-Biotina (4). Finalmente se induce un viraje cromático mediante una reacción química catalizada por peroxidasa.**

#### 2.4.2.1 Kit DAKO

Para la preparación de muestras se utilizó el kit DAKO EnVision Systems+HRP para anticuerpos primarios de ratón que contiene reactivo para bloqueo de peroxidasa (Peroxidase block), polímero marcado-HRP- anti- ratón (Labelled polymer-HRP- anti-mouse), DAB+ Buffer Substrato (DAB+ Substrate buffer) y DAB+ Cromógeno (DAB+ Chromogen) (Figura 24).



**Figura 24: Kit DAKO EnVision+ System-HRP (DAB) para uso con anticuerpos primarios de ratón**

El kit DAKO EnVision+ System, HRP es usado para la identificación cualitativa de antígenos mediante microscopía de tejidos embebidos en parafina, tejidos criostáticos o preparaciones celulares (Dadabayev R., 2004).

Los reactivos de este kit se basan en lo siguiente (DAKO'S LAB, 1998; Dadabayev R., 2004; Agilent Technologies, 2016):

- Peroxidase block: Suprime la fosfatasa alcalina y la peroxidasa endógena. No bloquear estas enzimas puede dar lugar a falsos positivos.
- Labelled polymer-HRP- anti-mouse: Este sistema se basa en un polímero marcado con peroxidasa que se encuentra conjugado con anticuerpos secundarios.
- DAB+ Substrate buffer y DAB+ Chromogen: La tinción se completa con 3,3'-diaminobencidina (DAB) + cromógeno de sustrato. La DAB al oxidarse da como resultado un precipitado de color marrón en el sitio del antígeno.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La frecuencia de patologías cartilagosas ha ido en incremento a nivel mundial, generando un problema de salud y económico. Dentro de las enfermedades que afectan el cartílago encontramos patologías congénitas, traumáticas, de origen reumatoide, neoplasias y degenerativas. Entre las patologías degenerativas podemos encontrar la

osteoartritis, responsable del 50% de las patologías congénitas crónicas en la población de avanzada edad (González Fernández, 2014).

La osteoartritis (OA), también llamada artrosis u osteoartrosis, caracterizada por cambios en el metabolismo del condrocito que culmina en la degradación de la matriz. En 1998, La National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) encontró que la prevalencia de osteoartritis de rodilla se incrementa desde 0,1% en personas de 25-34 años hasta 10-20% en personas de 65-74 años. Estudios de Frammighan encontraron porcentajes más elevados, de 30% para personas de 65-74 años (Chávez C., 1998). En México, existen pocas evidencias acerca de la prevalencia e incidencia global de la enfermedad. La encuesta nacional de salud (ENSA II) de 1998 la ubica como la segunda causa de morbilidad con 14% en personas mayores de 60 años de edad. La incidencia de OA de cadera es 88/ 100,000 personas por año, la de rodillas 240/100,000 personas por año. La incidencia de OA de rodillas es 1% por año en mujeres entre 70 a 89 años de edad (Lavalle Montalvo, 2010). Estudios en poblaciones específicas de México han reportado una frecuencia de OA que va desde 2,3 % hasta 17,3 % (Arellano Pérez Vertti, Argüello Astorga, Hernández Terán, & García Salcedo, 2013). Según la OMS, afecta a un 9,6% de los hombres y al 18% de las mujeres con edades superiores a los 60 años.

Con las estadísticas existentes, se considera a la Ingeniería de tejidos como una de las alternativas más viables para la solución de estos problemas.

## **4. OBJETIVOS**

### *4.1 Objetivo general*

- Comparar la viabilidad de una matriz polimérica de PCL-PLA y una matriz polimérica de PCL-PLA-Ag para reemplazo de tejido cartilaginoso

### *4.2 Objetivos particulares*

- Extraer una muestra de cartílago de *Oryctolagus cuniculus* (conejo Nueva Zelanda).

- Cultivar el tejido cartilaginoso.
- Evaluar la especie celular cultivada por medio de una inmunohistoquímica.
- Sembrar el cultivo en los polímeros.
- Valorar la viabilidad de los polímeros a través del método de MTT.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### *5.1 Obtención del tejido cartilaginoso*

La cirugía para la toma de muestra de tejido cartilaginoso fue llevada a cabo por la Dra. Raya Rivera Atlántida Margarita y el Dr. Esquiliano Rendón Diego Ricardo, investigadores del “Departamento de Urología y Ginecología” y jefes del “Laboratorio de Ingeniería de tejidos” con apoyo del M.V.Z. Raúl Castro Luna y Marco Antonio Ochoa Arias, encargados del “Laboratorio A de Bioterio” en el “Hospital Infantil de México Federico Gómez”, (Figura 25).

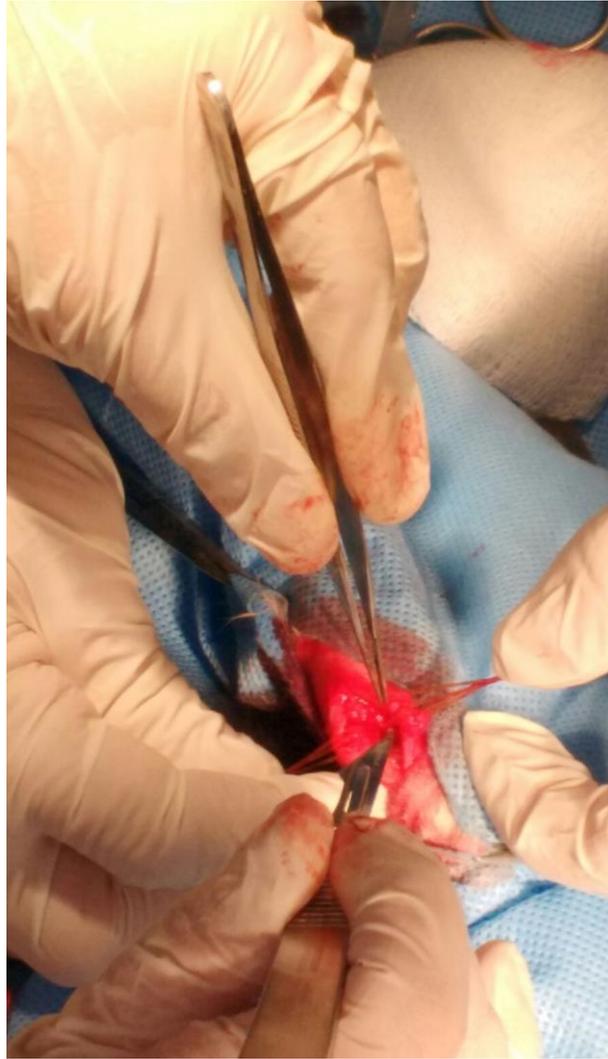
Se tomaron biopsias de cartílago articular de 3 conejos machos raza Nueva Zelanda. Los conejos se tranquilizaron con una inyección intramuscular de Acepromacina (1-3 mg/Kg) y Ketamina (44-50 mg/Kg), posteriormente se anestesiaron con una inyección intramuscular de Ketamina/Acepromacina (75 mg/Kg y 5 mg/Kg) y una inyección intravenosa de Pentobarbital (28 mg/Kg). Bajo condiciones asépticas se tomaron las biopsias de ambas rodillas de los conejos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, las cuales fueron transportadas al laboratorio de Ingeniería de Tejidos con PBS frío para ser procesadas (Figura 26 y Figura 27).



**Figura 25: La cirugía para la toma de biopsias fue llevada a cabo en el “Bioterio” del “Hospital Infantil de México Federico Gómez”.**



**Figura 26: Área de la cual fueron obtenidas las muestras de cartílago articular.**

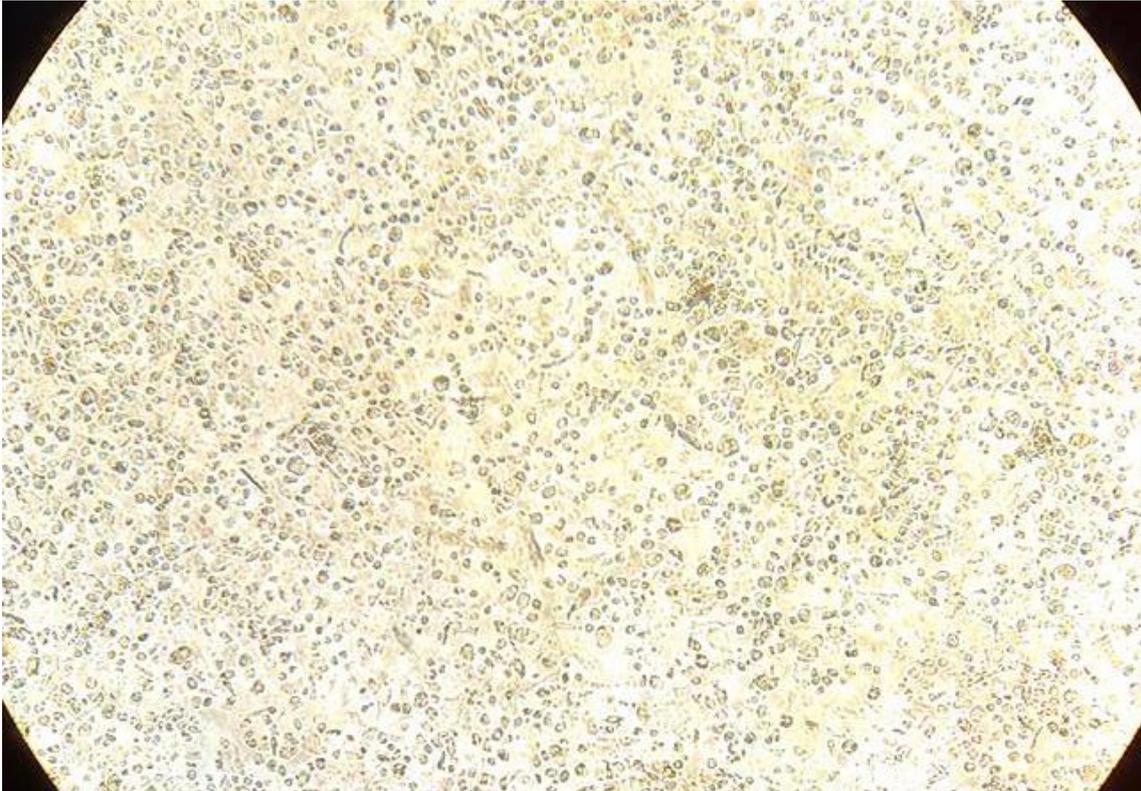


**Figura 27: Extracción de cartílago articular.**

### *5.2 Cultivo celular de tejido cartilaginoso*

En una campana de flujo laminar bajo condiciones estériles, las biopsias de cartílago fueron lavadas con PBS para retirar el exceso de sangre y se colocaron por separado en cajas petri de 100mm x 20mm para disgregarlas mecánicamente en trozos de aproximadamente 2 mm los cuales se colocaron en 10 ml de Tripsina 0.05% - EDTA (0.53 mM) durante 30 minutos en agitación continua a 37 °C. Posteriormente se dejó sedimentar y se reservó el tejido; los sobrenadantes se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 10 minutos para obtener los botones celulares los cuales se lavaron 1 vez con PBS y se sembraron en una caja petri de 10 mL en medio de cultivo F12 suplementado con SFB al 10%, antibiótico-antimicótico. A los sedimentos tisulares se les agregaron 10 ml de la solución de Colagenasa tipo II y se mantuvieron en agitación continua a 37 °C,

las siembras celulares se recogieron cada 15 minutos hasta la disgregación total del tejido de la siguiente manera: cada 15 minutos el tejido se dejó sedimentar y los sobrenadantes obtenidos se resuspendieron con 5 ml de medio suplementado durante 30 segundos y posteriormente se centrifugaron para obtener el botón. Las células obtenidas (Figura 28) se sembraron en cajas petri de 10 mL en medio de cultivo F12 suplementado con SFB al 10%, antibiótico-antimicótico y se mantuvieron en incubación a 37°C, en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5 % y humedad saturada (condiciones de cultivo estándar).



**Figura 28: Condrocitos de conejo a 40X.**

### *5.3 Cambio de medio de cultivo*

En campana de flujo laminar bajo condiciones estériles se llevó a cabo el cambio de medio de cultivo F12 suplementado con SFB al 10%, antibiótico-antimicótico una vez por semana. El medio fue succionado con micropipeta y expulsado suavemente sobre la superficie del plato para ayudar a desprender sustancias excretadas y adheridas en el fondo. Posteriormente, el medio fue retirado y desechado para ser reemplazado con medio fresco a 37°C. Las muestras continuaron bajo condiciones de cultivo estándar.

#### *5.4 Pase celular*

Cuando una placa llega al 80% de su capacidad es necesario llevar a cabo este procedimiento, el cual consiste en despegar las células de una placa y resembrarlas en dos o más para disminuir la cantidad de las mismas y promover su proliferación en monocapa.

En campana de flujo laminar bajo condiciones estériles se realizaron los pases necesarios en una relación 1:2 hasta obtener la cantidad necesaria de células para los ensayos experimentales. El medio de cultivo contenido en la placa fue retirado y desechado. El cultivo fue lavado con PBS antibiótico-antimicótico 1X, succionándolo y expulsándolo suavemente sobre la superficie del plato para finalmente ser desechado. Posteriormente fueron añadidos 10mL de PBS-EDTA, las placas fueron incubadas con esta solución durante 5 minutos a 37°C, bajo condiciones de cultivo estándar.

Al terminar la incubación, se observó la placa en el microscopio invertido para asegurar que el EDTA reaccionó con el cultivo, esto es apreciable cuando las células cambian su morfología inicial a una más voluminosa o esférica. Subsiguiente a la observación, se desechó la solución.

Como se menciona anteriormente, uno de los objetivos de este procedimiento, es despegar las células del fondo de la placa, para lograr esto, se adicionaron 7 mL de tripsina a 37°C, las placas fueron incubadas con este reactivo durante 3 minutos bajo condiciones de cultivo estándar. Al término del tiempo de incubación, nuevamente fue observado el cultivo en el microscopio invertido para verificar que las células no se encontraran adheridas a la placa; en caso contrario, las placas fueron golpeadas suavemente contra una superficie firme. Al lograr la separación de las células, estas fueron succionadas y colocadas dentro de un tubo estéril para llevar a centrifugar con 10 mL de F12 suplementado con SFB al 10%, antibiótico-antimicótico.

Para la resiembra se agregó 1mL de F12 suplementado con SFB al 10%, antibiótico-antimicótico al tubo con el sedimento por cada placa trabajada y se resuspendió, para llevar a cabo un segundo lavado. Finalmente se agregó 1 mL por cada placa nueva a sembrar, se homogenizó el contenido del tubo y se colocó 1mL de la suspensión en cada placa nueva. Se agregaron 9 mL de F12 suplementado con SFB al 10%, antibiótico-antimicótico y las placas fueron incubadas bajo condiciones de cultivo estándar.

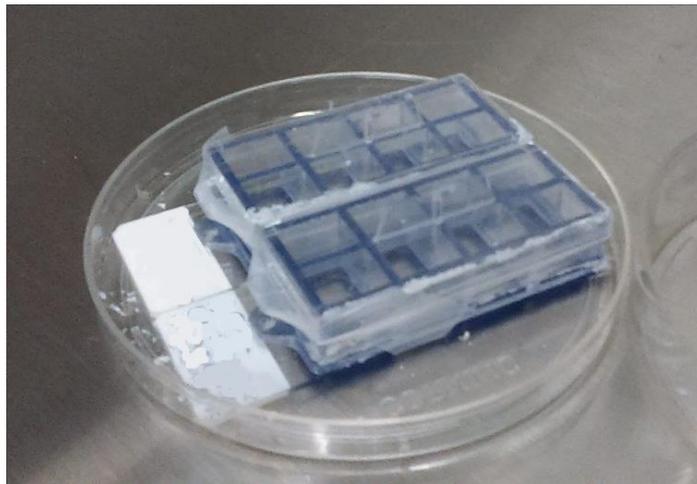
### *5.5 Siembra y fijación en laminillas LabTech para Inmunihistoquímica*

La siembra de laminillas consistió en adicionar 8 $\mu$ L de la suspensión concentrada obtenida durante el pasaje celular y 500 $\mu$ L de medio por pozo, esta laminilla fue incubada durante dos días en las condiciones ya conocidas.

Posterior al tiempo de incubación, el medio fue retirado y la laminilla se lavó con 200 $\mu$ L de PBS 1X a temperatura ambiente; la lámina se agitó con suavidad y se permitió reposar durante 5 minutos con el PBS 1X para después ser retirado. Este procedimiento se llevó a cabo una vez más.

La fijación celular se llevó a cabo con 100 $\mu$ L de Metanol-Acetona 1:1 frío, sin dejar caer a chorro, esta se dejó reposar durante 3 minutos. Finalmente, se llevaron a cabo los lavados más con PBS 1X.

Para almacenar la laminilla se adicionaron 400 $\mu$ L de PBS 1X y se selló con parafilm para refrigerar a 4°C (Figura 29).



**Figura 29: Laminillas LabTech fijadas y selladas con Parafilm. El tamaño de las cámaras puede generar microturbulencias capaces de desprender las células en la base, por lo que es importante que los líquidos resbalen por las paredes de la cámara antes de la fijación.**

### *5.6 Inmunohistoquímica*

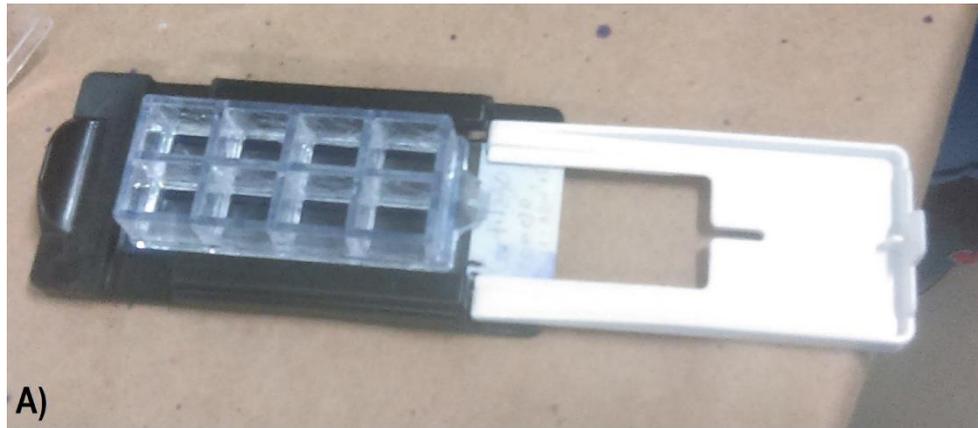
#### *5.6.1 Preparación del Anticuerpo*

Se seleccionaron los anticuerpos a utilizar con base a la bibliografía, cuidando que estos fueran anti-ratón con la finalidad de asegurar su compatibilidad con el kit Dako. Se prepararon en una dilución 1:100 con albumina por las recomendaciones del fabricante (Anexo 3 y 4).

### *5.6.2 Preparación de muestras*

Antes de comenzar el procedimiento, la laminilla fijada fue lavada dos veces con 500  $\mu$ L de PBS 1X. Cuando aseguramos la limpieza de la laminilla se agregaron 2 gotas de Peroxidase block y se permitió su reacción durante 10 minutos para posteriormente retirar el reactivo. La laminilla fue lavada con detergente Tritón X-100 al 1%, para facilitar el acceso de los anticuerpos al interior del tejido, por duplicado y le fue retirado el exceso de líquido. Se agregaron las diluciones de los anticuerpos primarios cuidando cubrir en su totalidad la monocapa fijada en la lámina, estos se dejaron incubar durante 30 minutos, consecutivamente fueron retirados y la laminilla nuevamente se sometió a lavado y secado. A continuación, se adicionó Labelled polymier-HRP-anti-mouse hasta cubrir la monocapa y la laminilla fue incubada, lavada y secada nuevamente bajo las mismas condiciones para poder colocar la mezcla de DAB-sustrato+ DAB cromógeno (1000  $\mu$ L-50 $\mu$ L) hasta cubrir la monocapa, dicha mezcla se dejó incubar durante 7 minutos y fue lavada dos veces con agua inyectable.

Finalizando el uso del kit Dako, se añadieron 100  $\mu$ L de hematoxilina de Mayer, como contracolorante nuclear para el DAB+ cromógeno, a cada pozo y se permitió reaccionar durante 1 minuto, esta fue lavada con agua inyectable y se procedió a la deshidratación de la muestra usando alcohol al 50, 70, 80 y 96%. Finalmente se agregó alcohol-xilol durante 5 minutos y se montó de forma permanente (Figura 30) la muestra para ser llevada al microscopio para su observación.

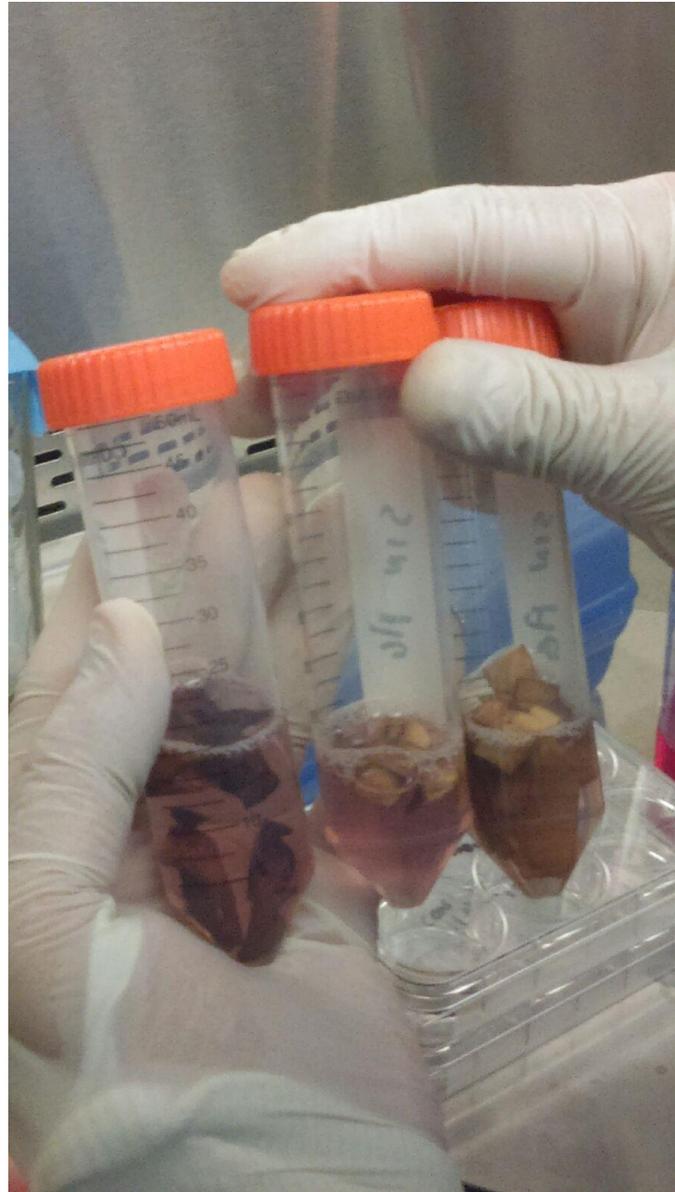


**Figura 30: Procedimiento para la fijación de inmunohistoquímica en laminilla Labtech.**  
**A) Para montar permanentemente la muestra, se separó la base de la laminilla utilizando el dispositivo otorgado por el fabricante.**  
**B) Se colocó una gota de resina y con ayuda del alcohol-xilol esta fue repartida de manera homogénea en toda la laminilla.**  
**C) Se colocó el cubreobjetos y se dejó secar para sellar el perímetro con esmalte de secado rápido.**

### *5.7 Siembra en polímero*

Los andamios de PCL-PLA y PCL-PLA-Ag se esterilizaron y se hidrataron durante 2 horas a 37°C en 13 mL de F12 suplementado con SFB al 10%, antibiótico-antimicótico (Figura 31). Posteriormente se colocaron por separado en cajas de 6 pozos. Se obtuvieron suspensiones celulares a una concentración de  $20 \times 10^6$  cel/mL (Anexo 2) de los 6 cultivos celulares de condrocitos correspondientes a cada rodilla de conejo. Los andamios hidratados se impregnaron con dichas soluciones y se mantuvieron durante 3 horas en incubación bajo condiciones de cultivo estándar. Posteriormente se agregaron 2 ml de medio de cultivo F12 suplementado con SFB al 10%, antibiótico-

antimicótico. Los andamios se mantuvieron en incubación durante 24 horas bajo condiciones de cultivo estándar y se cambió el medio de cultivo agotado por medio fresco, se mantuvieron durante 7 días más en incubación hasta lograr la conformación de los neo-cartílagos.



**Figura 31: Andamios de PCL-PLA y PCL-PLA-Ag sumergidos en medio de cultivo F12 suplementado con SFB al 10%, antibiótico-antimicótico para su hidratación**

### *5.7 Proliferación / Viabilidad De Células Cartilagosas en el polímero*

Transcurridos los 7 días de la incubación para la formación de los de los neo-cartílagos, se llevó a cabo el ensayo de MTT para viabilidad celular dentro de campana de flujo laminar y en ausencia de luz (Figura 32). Se retiraron 200  $\mu$ L de medio de cultivo contenido en cada pozo, se reemplazó el volumen extraído por 200  $\mu$ L de reactivo de MTT. La placa de 6 pozos fue forrada con aluminio y se llevó a incubación durante 4 horas en condiciones de cultivo estándar. Al terminar el tiempo de incubación se retiró el contenido líquido de los pozos. Para evidenciar la reacción del MTT se adicionaron 200  $\mu$ L de ácido isopropanol 0.4%. Las placas forradas de aluminio fueron llevadas a agitación suave durante 10 minutos. Terminada la agitación, el ácido isopropanol 0.4% fue colocado en placas de 96 pozos para la lectura de las muestras.



**Figura 32: Preparación de muestras para el protocolo de "Viabilidad celular por medio del reactivo de MTT"**

La lectura de muestras fue llevada a cabo en el departamento de "Patología experimental" dentro del "Hospital Infantil de México Federico Gómez", se utilizó un equipo para lectura de pruebas de ELISA Multiskan Ascent Labsystem y el software Multiskan Ascent V1.24 con longitud de onda ajustada a 540 nm.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Inmunohistoquímica

Se colocaron los anticuerpos COL2A1 y COL-1 conforme la Figura 33. Las fotografías obtenidas se muestran a continuación (Figura 34-Figura 35).

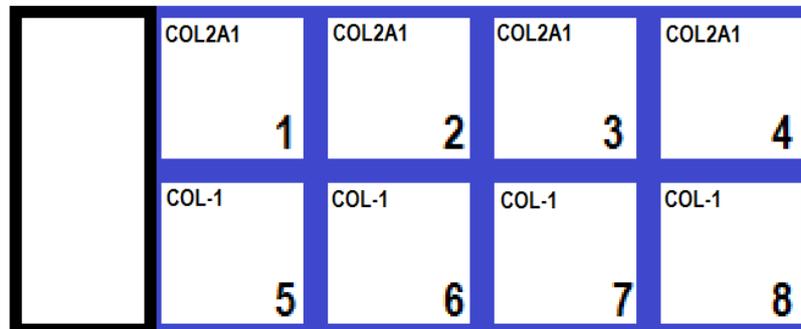


Figura 33: Diagrama de laminilla LabTech con los anticuerpos correspondientes a cada pozo

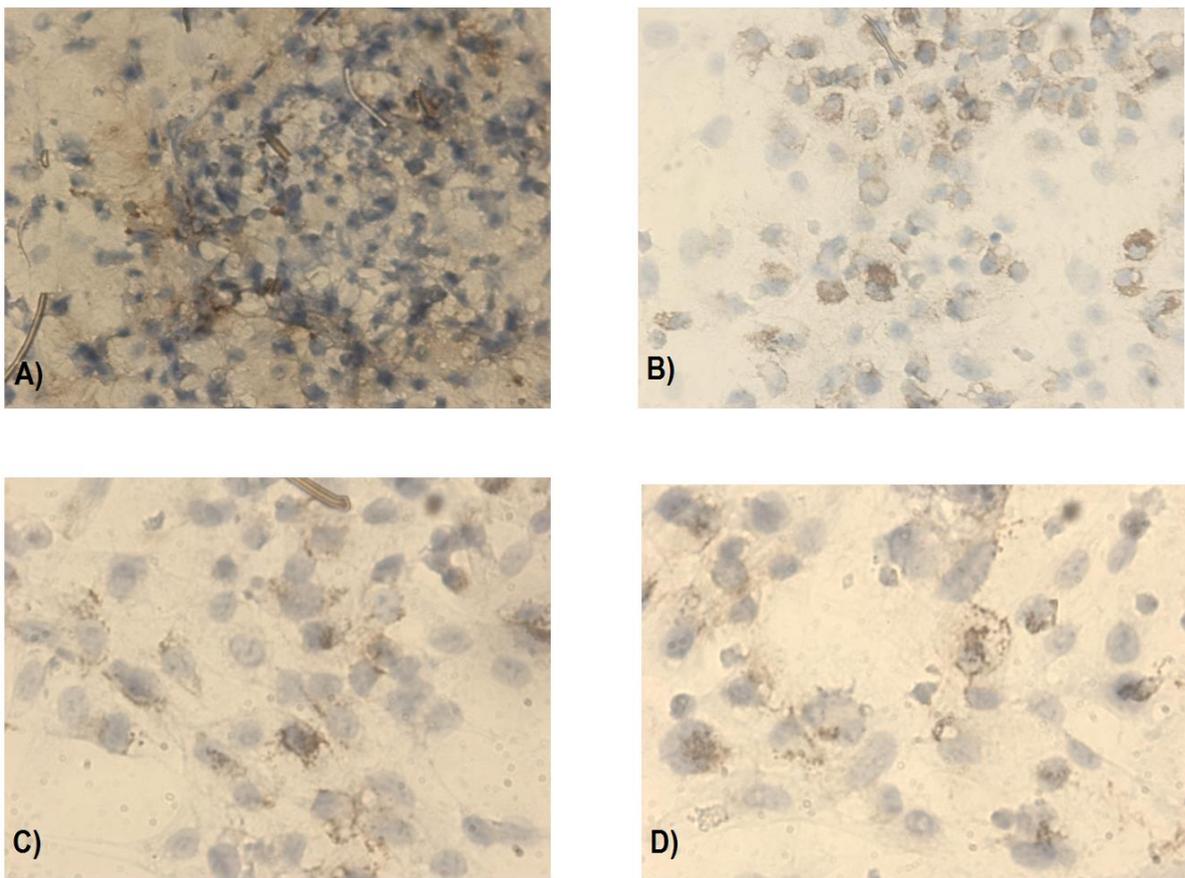
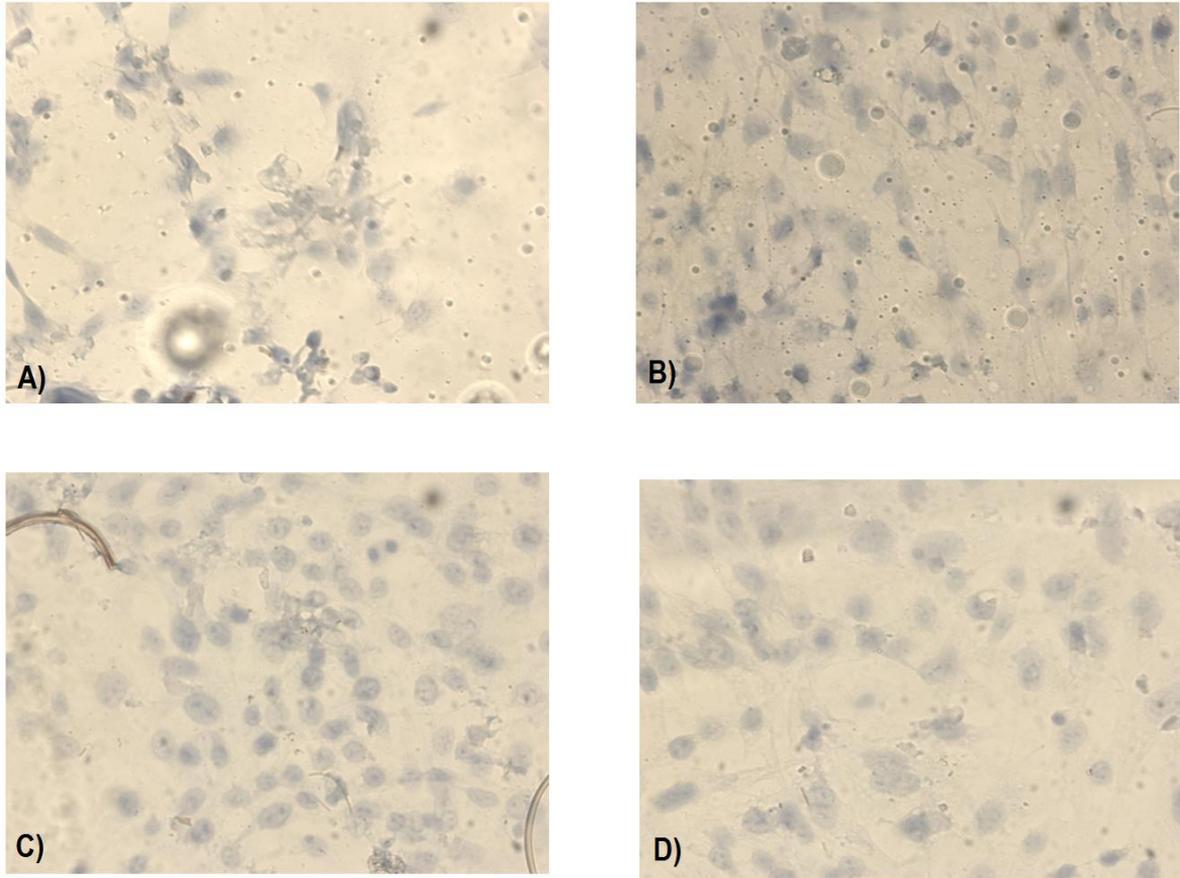


Figura 34: Células tratadas con Anticuerpo COL2A1. Los núcleos se han teñido en color azul, el colágeno tipo II es visible en tonos pardos.  
A) y B) Muestras con un aumento de 40X.  
C) y D) Muestras con un aumento de 63X.

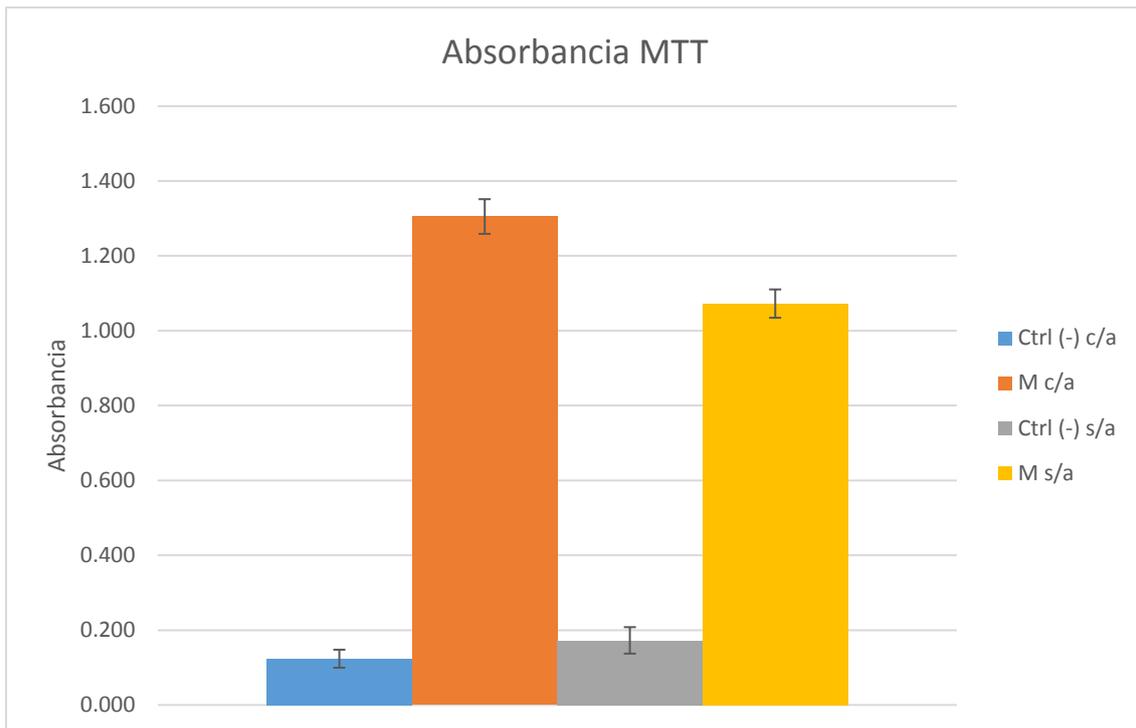


**Figura 35: Células tratadas con COL-1. Los núcleos se han coloreado de azul, la ausencia de colágeno tipo I es notable.**

**A), B), C) y D) Muestras con un aumento de 40X.**

### **6.2 Viabilidad por MTT**

Los datos obtenidos de la lectura de viabilidad por medio del método de MTT fueron tratados como se indica en el Anexo 5, obteniendo los siguientes resultados (Figura 36):



**Figura 36: Resultados de la lectura de MTT a 540nm. El control negativo del polímero con agregano obtuvo una absorbancia promedio de 0.124 con una desviación estándar de  $\pm 0.024$ , mientras que el control negativo del polímero sin agregano obtuvo una absorbancia promedio de 0.173 con una desviación estándar de  $\pm 0.035$ . La absorbancia promedio del polímero con agregano con muestra celular logró un valor de 1.305 con una desviación estándar de  $\pm 0.046$ . El polímero sin agregano con muestra celular obtuvo una absorbancia promedio 0.233 puntos por debajo del polímero con muestra y agregano, sin embargo, logró una desviación estándar menor, con un valor de  $\pm 0.038$ .**

## 7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1 Inmunohistoquímica

La toma de muestras de tejido articular para la obtención de condrocitos puede implicar algunas dificultades. La contaminación por fibroblastos de la superficie o fondo de la articulación es una de ellas; este problema es resuelto gracias la digestión con tripsina, sin embargo, el cultivo de condrocitos presenta dificultades durante la propagación *in vitro*, puesto que tienden a desdiferenciarse (Monfort-Faure, 2016), cambiando su fenotipo redondeado o poligonal al de los fibroblastos, por lo que es importante asegurar mediante la inmunohistoquímica la especie celular que se sembró en el andamio.

En la Figura 34 A) y B) podemos notar la presencia de células que han dado positivo al anticuerpo COL2A1. En la Figura 34 D) y C) podemos apreciar mejor la expresión de la colageno tipo II gracias al aumento utilizado y a la baja densidad celular. En la Figura 35 podemos observar la presencia de células, pero no expresan actividad

para COL-1. Sabemos que los fibroblastos tienen gran cantidad de fibras de colágeno tipo I (Universidad Central de Venezuela, 2013), a diferencia de los condrocitos.

### *7.2 Viabilidad por MTT*

Gracias a la Figura 36 podemos confirmar que es posible la propagación de condrocitos en ambos polímeros, ya que estos presentan una absorbancia mayor a la generada por los andamios que fungieron como controles negativos.

Los resultados obtenidos entre los polímeros sembrados con condrocitos fueron los pronosticados. Se esperaba que el proteoglicano liofilizado en las fibras del polímero de PCL-PLA fuera reactivado con el agua contenida en el medio de cultivo F12 y promoviera la proliferación celular de los condrocitos por la naturaleza de los mismos, ya que como se mencionó con anterioridad, la matriz extracelular del tejido cartilaginoso contiene alto porcentaje de agregano.

Los datos obtenidos tienen una dispersión muy baja, los coeficientes de variación de los polímeros que contenían células fueron del 3.5%, lo que hace confiables los resultados.

## **8. CONCLUSIONES**

- Se logró un cultivo puro de condrocitos.
- Los polímeros elaborados a base de PCL-PLA son adecuados para el reemplazo de tejido cartilaginoso, siendo más efectivos cuando estos contienen agregano.

## **9. PERSPECTIVAS PARA LA INVESTIGACIONES**

- Considerando la desdiferenciación de los condrocitos durante su cultivo, resulta conveniente realizar una inmunohistoquímica del polímero después de haber sido inoculado.
- Por su alta especificidad como marcadores para el perfil fenotípico diferencial entre fibroblastos y condrocitos se propone hacer uso de los siguientes anticuerpos (Tabla 7).

- Se recomienda comenzar con los estudios *in vivo*, estos consisten en la implementación del polímero con cultivo celular en los conejos Nueva Zelanda.

**Tabla 7: Anticuerpos recomendados para la diferenciación de condrocitos y fibroblastos. Basado en (Battaglia, Lucero, Morhac, & Koziner; Dang, Torimoto, Schlossman, & al., 1990)**

Anticuerpo	Condrocitos	Fibroblasto
<b>CD26</b> Dipeptidil peptidasa IV presente en la membrana de los fibroblastos	-	+
<b>Agrecano</b>	+	-

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Dadabayev R., A. (21 de Diciembre de 2004). *DAKO EnVision+ System, Peroxidase*.  
Obtenido de Biocompare: <http://www.biocompare.com/Product-Reviews/41242-DAKO-EnVision-System-Peroxidase/>
- Lee, J. Y., Kim, K. H., Shin, S. Y., Rhyu, I. C., Lee, Y., Park, Y. J., . . . Lee, S. J. (2006).  
Enhanced bone formation by transforming growth factor-beta1-releasing  
collagen/chitosan microgranules. *J Biomed Mater Res A*, 530-539.
- Agilent Technologies. (2016). *Inmunohistochemistry*. Obtenido de Agilent  
Technologies:  
[http://www.agilent.com/cs/agilent/en/products/immunohistochemistry/ancillaries-  
for-ihc/blocking-reagents-buffers-diluents#0](http://www.agilent.com/cs/agilent/en/products/immunohistochemistry/ancillaries-for-ihc/blocking-reagents-buffers-diluents#0)
- Agrawal, C., & Ray, R. (2001). Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal  
tissue engineering. *J Biomed Mater Res*, 141-150.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. (1989). Cell  
adhesion, cell junctions and extracellular matrix. *THE MOLECULAR BIOLOGY  
OF THE CELL. GARLAND PUBLISHING, INC NEW YORK & LONDON*, 802-  
836.
- Alvarez Barreto, J. F. (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos:  
una introducción. *Revista de Estudios Transdisciplinarios* .
- American Type Culture Collection. (s.f.). MTT Cell Proliferation Assay. *Instruction  
guide*. USA: University Boulevard.
- Antunes Colaço, B. J. (Mayo de 2008). Obtención de cartílago in vitro para su  
utilización en ingeniería de tejidos. *Memoria para optar el grado de Doctor*.  
León, España: Universidad de León.
- Archer, C. W., & Francis-West, P. (2003). The chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol*,  
401-404.
- Arellano Pérez Vertti, R. D., Argüello Astorga, J. R., Hernández Terán, F., & García  
Salcedo, J. J. (2013). Factores de riesgo en osteoartritis de rodilla en una  
población mexicana de casos y controles. *Revista Cubana de Ortopedia y  
Traumatología*.
- Auger, F. A., Rouabhia, M., Goulet, F., Berthod, F., Moulin, V., & Germain, L. (1998).  
Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen-populated  
hydrated gels: clinical and fundamental applications. *Medical & Biological  
Engineering & Computing*, 36, 801-812.

- Banks, W. J. (1992). Tecido de sustentação-Cartilagem / Tecido de sustentação-osso. En *Histologia Veterinária Aplicada* (págs. 124-132, 137-154). Editora Manole Ltda.
- Barrère, G. U., & al., e. (2008). Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. . *J Materials Science and Engineering*, 38-71.
- Battaglia, L., Lucero, G., Morhac, M., & Koziner, B. K. (s.f.). Técnica de cultivo de condrocitos autólogos. *Recista Argentina de Artroscopía*.
- Bautista Garfias , C. R., Acosta García, E., & Toledo García, I. I. (s.f.). *Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino frescos y congelados*. Obtenido de ejournal unam:  
<http://www.ejournal.unam.mx/rvm/vol31-02/RVM31204.pdf>
- Benjamin, M., & J.R., R. (2004). Biology of fibrocartilage cells. *International Review of Cytology*.
- Binyamin, G., Shafi, B. M., & Mery, C. M. (2006). Biomaterials: a primer for surgeons. . *Semin Pediatr Surg*, 276-283.
- Borras Murcia, D. (23 de Abril de 2012). *Inmunohistoquímica*. Obtenido de Citología y Patología Veterinaria: <https://patolvet.wordpress.com/tag/inmunohistoquimica/>
- BOT, X. (s.f.). *Xiapex® BOT: Base de datos del medicamento*. Obtenido de Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.: <http://www.portalfarma.com>
- Boucard, N., Viton, C., Agay, D., Mari, E., Roger, T., Chancerelle, Y., & Domard, A. (2007). The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*, 3478-3488.
- Browning, J., Saunders, K., Urban, J. P., & Wilkins, R. J. (2004). The influence and interactions of hydrostatic and osmotic pressures on the intracellular milieu of chondrocytes. *Biorheology*, 299-308.
- Buckwalter, J., & Mankin, H. (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. . *AAOS Instr Course*, 477-486.
- Buckwalter, J., & Rosenberg, L. C. (1988). Electron microscopic studies of. *Electron Microsc Rev*, 87-112.
- Buckwalter, J., Mankin, H., & Grodzinsky , A. (2005). Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect.*, 465-480.
- Cassinelli, C., & Morra, M. a. (2003). Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 2. In vitro experiments. . *Int J Oral Maxillofac Implants*, 46-52.
- celeromics. (s.f.). *celeromics*. Obtenido de <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.php>

- Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular. (s.f.). *Líneas de investigación*. Obtenido de Universidad Politécnica de Valencia:  
<http://www.upv.es/cb/investigacion/lineas-es.html#materiales>
- Chávez C., J. E. (1998). De la enfermedad articular degenerativa a la osteoartritis: avances en el conocimiento de su patogénesis y tratamiento. *Revista Peruana de Reumatología*.
- Chew, S. Y., Wen, Y., Dzenis, Y., & Leong, K. W. (2006). The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. *Curr Pharm Des*, 47-51.
- Chung, T. W., Tsai, Y. L., Hsieh, J. H., & Tsai, W. (2006). Different ratios of lactide and glycolide in PLGA affect the surface property and protein delivery characteristics of the PLGA microspheres with hydrophobic additives. *J Microencapsul*, 15-27.
- Collins, P. (1995). Embryology and development. En *Gray's Anatomy* (págs. 264-298). Churchill Livingstone.
- Colorado, A. C., Aguelo, C. A., & Moncada, M. E. (2013). Analysis of biomaterial for skin tissue engineering: Review. *Ingeniería Biomédica*.
- Cross, M., & Dexter, T. M. (1991). Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*, 271-280.
- DAKO'S LAB. (5 de Julio de 1998). DAKO LSAB 2 Kit, HRP. DAKO EnVision System, HRP. *Summary of Safety and Effectiveness*.
- Dang, N. H., Torimoto, Y., Schlossman, S. F., & al., e. (1990). CD4 helper T-cell activation: functional involvement of two distinct collagen receptors, IF7 and VLA integrin family. *J. Exp. Med.*
- de Castro de Pardo, C. (1 de Diciembre de 2006). Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba de MTT. *Práctica IV.2*. Bogotá, Colombia: Facultad de Medicina. Fundación Universitaria San Martín.
- DeFail, A. J., Chu, C. R., Izzo, N., & Marra, K. G. (2006). Controlled release of bioactive TGF-beta 1 from microspheres embedded within biodegradable hydrogels. *Biomaterials*, 1579-1585.
- Denizot, F., & R., L. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Meth.*, 271-277.
- Doshi, J. (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J of Electro*, 151-160.
- Duque Sánchez, L. M., Rodríguez, L., & Marcos, L. (2013). Electrospinning: la era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 10-27.

- Elder SH, S. S. (2006). Chondrocyte response to cyclic hydrostatic pressure in alginate versus pellet culture. *J Orthop Res*, 740-747.
- Errington, R., Fricker, M. D., Wood, J. L., Hall, A. C., & White, N. S. (1997). Four-dimensional imaging of living chondrocytes in cartilage using confocal microscopy: a pragmatic approach. *Am J Physiol*, 1040-1051.
- Escobar M., L., Rivera, A., & Aristizábal G., F. A. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae vol.17 no.1* .
- Estrada, C., Paz, A. C., & López, L. E. (2006). Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones básicas. *EIA, Escuela de Ingeniería de Antioquia*, 93-100.
- Eurell, J. A., & Sickle, D. C. (1998). Connective and supportive tissues. En L. W. Wilkins, *Textbook of Veterinary Histology* (págs. 44-51).
- Evangelista, M. B., Hsiong, S. X., Fernandes, R., Sampaio, P., Kong, H. J., Barrias, C. C., . . . Granja, P. L. (2007). Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix. *Biomaterials*, 3644-3655.
- Falke, G. F., & Atala, A. (2000). Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch Argent Pediatr*, 103-105.
- Fang, J., Niu, H., Lin, T., & Wang, X. (2008). Applications of Electrospun Nanofibers. *Chin. Sci. Bull*, 2265.
- Fernández Díaz, J. (3 de Noviembre de 2013). SCYKNESS. Obtenido de <https://scykness.wordpress.com/tag/cultivo-celular/>
- Freed, L. E., Hollander, A. P., Martin, I., Barry, J. R., Langer, R., & Vunjak-Novakovic, G. (1998). Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp Cell Res*, 58-65.
- Gamboa, W., Mantilla, O., & V., C. (2007). Producción de micro y nanofibras a partir de la técnica "electrospinning" para aplicaciones farmacológicas. *Sociedad Cubana de Bioingeniería*.
- Garzón, A. A. (2006). Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones Básicas. *Revista EIA*, 93-100.
- Ghadially, F. N., Lalonde, J. M., & Wedge, J. (1983). Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J Anat.*, 773-791.
- Gibson, P., Schreuder-Gibson, & Pentheny, H. (1998). Electrospinning technology: Direct application of tailorable ultrathin membranes. *J. Coated Fab*.
- Gilbert, S. F. (2005). *Biología del desarrollo*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Goldring, M. B. (2006). Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* , 1003-1025.

- Gomes, M. E. (2005). Injectable Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. En R. L. Roman, *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (págs. 29-38). Boca Raton: CRC Press.
- González Fernández, M. L. (Junio de 2014). Aplicación de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo y médula ósea para su utilización en regeneración de tejido cartilajinoso. *Tesis Doctoral*. León, España.
- Guilak, F., Ratcliffe, A., & Mow, V. C. (1995). Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: a confocal microscopy study. *J Orthop Res*, 410-421.
- H. Ross, M., & Pawlina, W. (2008). *Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. Editorial Medica Panamericana.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E., & Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. . *J. Immunol. Methods*, 203-210.
- Hernández Ramírez, P. (2009). Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas. *Revista Cubana de Hematología Inmunología Hemoterapia*.
- Hernández, P. (2006). Medicina regenerativa II. Aplicaciones, realidad y perspectivas de la terapia celular. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*.
- Hickok, N. J., Hass, A. R., & Tuan, R. S. (1998). Regulation of chondrocyte differentiation and maturation. *Microscopy Research and Technique*, 174-190.
- Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites. *Compos. Sci. Technol*, 2223.
- Huckle, J., Dootson, G., & Medcalf, N. (2003). Differentiated chondrocytes for cartilage tissue engineering. *Novartis Found Symp*.
- Ikada, D. (2006). Challenges in tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface*, 589-601.
- Instituto Nacional de Bioingeniería e Imágenes Biomédicas. (Julio de 2013). *NIH*. Obtenido de Transformación de Descubrimientos en Salud: [https://www.nibib.nih.gov/sites/default/files/Ingenier%C3%ADa%20de%20Tejidos%20y%20Medicina%20Regenerativa\\_0.pdf](https://www.nibib.nih.gov/sites/default/files/Ingenier%C3%ADa%20de%20Tejidos%20y%20Medicina%20Regenerativa_0.pdf)
- Instrumentación Científico Técnica. (2015). *Catálogo 2015*. Obtenido de Dispara BD: <http://www.ictsl.net/plaintext/productos/instrumental/0000009f3a12f7acf.html>
- Jiang, H., Hu, Y., Li, Y., Zhao, P., Zhu, K., & Chen, W. (2005). A Facile Technique to Prepare Biodegradable Coaxial Electrospun Nanofibers for Controlled Release of Bioactive Agents. *J. Controlled Release*, 237.

- Junqueira, L. C., Carneiro, J., & Kelley, R. D. (1998). Chapter 7-Cartilage. En *Basic Histology* (págs. 127-133). Large Medical Book/Macgraw-Hill.
- Kangwon, L., Eduardo, A. S., & David, J. M. (2010). Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of the Royal Society Interface*.
- Kempen, D. H., Lu, L., Hefferan, T. E., Creemers, L. B., Maran, A., Classic, K. L., . . . Yaszemski, M. J. (2008). Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 3245-3252.
- Kim, B. S., E., B. C., & Atala, A. (2000). Biomaterials for tissue engineering. . *World Journal of Urology*. Vol. 18, No.1 , 2-9.
- Kon'kov, A. S., Pustovalova, O. L., & I., A. I. (2010). Biocompatible materials from regenerated silk for tissue engineering and medicinal therapy. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 739-744.
- Kuboki, Y., Takita, H., Kobayashi, D., Tsuraga, E., Inoue, M., Murata, M., . . . Ohgushi, H. (1993). BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. . *J Biomed Mater Res* , 141-150.
- Laboratorio Microvet. (s.f.). *Laboratorio Microvet*. Obtenido de Medio HAM con Mezcla de Nutrientes F12: [http://www.laboratoriomicrovet.com/medios/ham\\_f12.html](http://www.laboratoriomicrovet.com/medios/ham_f12.html)
- Lacave, I. M., & Caballero, T. G. (2014). *Atlas de inmunohistoquímica: caracterización de células, tejidos y órganos normales*. Diaz de Santos.
- Lange, C., Cakiroglu, F., Spiess, A., Cappallo-Obermann, H., Dierlamm, J., & Zander, A. (2007). Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 18-26.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 920-926.
- Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D., & Farson, D. (504). Electrospinning for Tissue Engineering Scaffolds. *Mat. Sci. Eng C*, 2007.
- Lanza, R., Langer, R., & Vacanti, J. (2007). *Principles of tissue engineering*. Academic Press.
- Lanza, R. P., Langer, R., & Vacanti, J. P. (2000). *Principles of tissue engineering*. San Diego: Academic Press.
- Laurencin, C. T., Ambrosio, A., Borden, M. D., & Cooper, J. (1999). Tissue engineering: orthopedic applications. . *Annu Rev Biomed Eng* , 19-46.
- Lavalle Montalvo, C. (6 de Junio de 2010). *Facultad de Medicina de la UNAM*. Obtenido de [http://www.facmed.unam.mx/sms/temas/2010/06\\_jun\\_2k10.pdf](http://www.facmed.unam.mx/sms/temas/2010/06_jun_2k10.pdf)

- Lee, R., & Urban, J. (1997). Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J.* 321 (1), 95-102.
- Li, C., Vepari, C., Jin, H. J., Kim, H. J., & Kaplan, D. L. (2006). Electrospun Silk–Bmp–2 Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*, 3115.
- Li, W., Caterson, E., Tuan, R., & Ko, F. (2002). Electrospun Nanofibrous Structure a Novel Scaffold for Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res*, 613.
- Lizarbe, M. A. (2007). Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat*, 227-249.
- López Obregón, B. (2013). Técnicas quirúrgicas: Sustitutos epidérmicos. Cultivo de queratinocitos. *Proyecto Lumbre*, 7-10.
- Ma, P., & Wei, G. (2005). Nanostructured scaffolds for tissue engineering and regeneration. Handbook of nanostructured biomaterials and their applications in nanobiotechnology, Volume 1. En P. Ma, & G. Wei.
- MacNeil, S. (2008). Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials Today*, 11, 26-35.
- Malaekheh-Nikouei, B. S. (2006). The effect of different grades of PLGA on characteristics of microspheres encapsulated with cyclosporine. *Curr Drug Deliv*, 343-349.
- Mauney, J. R., Volloch, V., & Kaplan, D. L. (2005). Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng*, 5-6.
- McDermott, I. D., & Amis, A. A. (1990). The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res*, 8-18.
- Meyer, U., Meyer, T. H., Handschel, J., & Wiesmann, H. P. (2009). Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine. *New York: Springer*.
- Monfort-Faure, J. (2016). Cultivo de condrocitos: la caja de Pandora continúa abierta. *Reumatología Clínica*.
- Moreland, L. W. (2003). Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: Mechanisms of action. . *Arthritis Res Ther*, 54-67.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, 55-63.
- Murillo García, M. S. (2015). Tejido cartilaginoso. Generalidades.
- Narváez, M. (7 de Abril de 2016). *CONACYT, Agencia Informativa*. Obtenido de De los biomateriales a la ingeniería de tejidos: <http://www.conacytprensa.mx/index.php/tecnologia/materiales/6079-de-los-biomateriales-a-la-ingenieria-de-tejidos-reportaje>

- Noden, D., & Delahunta, A. (1990). Organización de los embriones de los vertebrados/Desarrollo das extremidades. En *Embriología de los animales domésticos*. (págs. 11-21, 213-215). Zaragoza.
- Nordahl, J., Andersson, G., & Reinholt, F. (1998). Chondroclasts and osteoclasts in bones of young rats: comparison of ultrastructural and functional features. *Calcif Tissue Int.*, 401-408.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., . . . Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 143-147.
- Pontino, M. V., Di Giulio, B., Fernández, C., Imperiale, B., Bondon, A., & Morcillo, N. (2006). Evaluación de un micrométodo colorimétrico para determinar la concentración inhibitoria mínima de drogas antituberculosas frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. argent. microbiología*.
- Poole, A., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., & Lavery, S. (2001). Composition and structure of articular cartilage: a template tissue repair. *Clin Orthop*, 26-33.
- Probiotek. (2014). *Fetal Bovine Serum, Regular (Heat Inactivated)*. Obtenido de <http://www.probiotek.com/producto/fetal-bovine-serum-regular-heat-inactivated/>
- QuimiNet. (2016). *¿Qué es el SFB y su aplicación?* Obtenido de <https://www.quiminet.com/articulos/que-es-el-sfb-y-su-aplicacion-27555.htm>
- Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W. E., Lim, T. C., & Ma, Z. (2005). An Introduction to Electrospinning and Nanofibers. National University of Singapore.
- Ravichandran, R., Liao, S., Pliszka, D., Raghunath, M., Ramakrishna, S., & Chan, C. K. (2012). Biomimetic Surface Modification of Titanium Surfaces for Early Cell Capture by Advanced Electrospinning. *Biomedical Materials*.
- Raya Rivera, A. M., Esquiliano Rendón, D. R., & González Pérez, R. (s.f.). Construcción de Andamios a Base de Policaprolactona (PCL) - Acido Poliláctico (PLA) recubiertos con Polipirrol-lodo (PPyl), para Ingeniería de Cartílago. *Protocolo extenso de bioseguridad*. Ciudad de México, México: Hospital Infantil de México "Federico Gómez".
- Rendal Vázquez, M. E., Fernández Mallo, O., Miguez Torre, I., Bermúdez González, T., Ponte Velasco, N., & Sánchez Ibáñez, J. (2013). Papel del banco de piel en el tratamiento del paciente con quemaduras graves. *Proyecto Lumbre*, 65-71.
- Rincón, M., Rodríguez, A., Londoño, M. E., & Echevarría, A. (2007). Fabricación y caracterización de una matriz tridimensional de hidroxiapatita macroporosa para aplicación en ingeniería de tejidos óseos. *EIA, Escuela de Ingeniería de Antioquia*, 87-95.

- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (1 de Mayo de 2013). *Assay Guidance Manual*. Obtenido de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Roa Ramirez, D. A., & Quintian Ayala, R. (2016). Situación actual de la Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa en Colombia. *Tesis de Licenciatura*. Bogotá, Colombia: Universidad de Ciencia Aplicadas y Ambientales.
- Saladin, K. S. (s.f.). *Anatomía y fisiología: la unidad entre forma y función (6a. ed.)*. McGrawHill.
- Salgado, A. J., Coutinho, O. P., & Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. . *Macromolecular Bioscience* 4, 743-765.
- Saltzman, M. W. (2000). Cell Interactions with Polymers. En R. L. R. Lanza, *Principles of Tissue Engineering* (pág. 221). San Diego: Academic Press.
- Sánchez Naranjo, J. C. (2008). Fisiología del condrocito articular. *Revista colombiana de Reumatología*.
- Schmal, H., Mehlhorn, A. T., Fehrenbach, M., Muller, C. A., Finkenzeller, G., & Sudkamp, N. P. (2006). Regulative mechanisms of chondrocyte adhesion. *Tissue Eng* , 741-750.
- Second Consensus Conference on definitions in Biomaterials. (1992). Reino Unido.
- Segretín, M. E. (s.f.). *ArgenBio*. Obtenido de <http://www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Eug.pdf>
- Shieh, S., & Vacanti, J. (2005). State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. . *Surgery*, 1-7.
- Sigma-Aldrich. (2016). *Ham's Nutrient Mixtures*. Obtenido de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/hams-nutrient-mixtures.html>
- Sill, T., & Von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Biomaterials*, 1989.
- Singh, R., & Dahotre, N. (2007). Corrosion degradation. *J Mater Sci Mater Med.*, 725-751.
- Stockwell, R. (1967). *The cell density of human articular and costal cartilage*. *J Anat.*
- Stockwell, R., & Scott, J. (1967). Distribution of acid glycosaminoglycans in human articular cartilage. *Nature*, 1376-1378.
- Sweigart, M. A., AufderHeide, A. C., & Athanasiou, K. A. (2003). Chapter1- Fibrochondrocytes and their Use in Tissue Engineering of the Meniscus. En *Topics in Tissue Engineering* (págs. 1-19). N. Ashammakhi & P. Ferretti.

- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., & al., e. (1986). An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods.*, 157-165.
- Takuma, S. (1962). Electron microscopy of cartilage resorption by chondroclasts. *J Dent Res*, 883-889.
- Taylor, G. (1969). Electrically Driven Jets. *Proc R Soc London, Ser A*, 313-453.
- The National Academies of Sciences. (2003). *Beyond Discovery*. Obtenido de [http://www7.nationalacademies.org/spanishbeyonddiscovery/bio\\_008233-01.html](http://www7.nationalacademies.org/spanishbeyonddiscovery/bio_008233-01.html)
- Tong, H., Zhang, X., & Wang, M. (2012). A New Nanofiber Fabrication Technique Based on Coaxial Electrospinning. *Mater. Lett*, 257.
- Universidad Central de Venezuela. (2013). Tejido Cartilaginoso. *Manual de Histología de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela*. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
- Universidad de los Andes. (2014). *Histología y Medicina ULA*. Obtenido de Laboratorio de Inmunohistoquímica: <http://www.medic.ula.ve/histologia/laboratorios/inmuno.htm>
- Urban, J. P. (1994). The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol* , 901-908.
- Vega Álvarez, J. A., García-Suárez, O., Fernández Monjil, D., & Del Valle Soto, M. E. (2016). Bioquímica y biología del cartílago articular. *Elsevier*, 391-400.
- Velasco Peña, M. A., & Garzón Alvarado, D. A. (2010). Implantes Scaffolds para regeneración ósea. Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*.
- Vunjak-Novakovic , G., & Freshney, R. I. (2006). Culture of cells of tissue engineering. *Wiley Interscience*, 491.
- Vunjak-Novakovic, G. (2003). The fundamentals of tissue engineering. *Novartis Found Symp.*, 34-46.
- Wei, G., & Ma , P. X. (2003). Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 25, 4749-4757.
- (2004). What is regenerative medicine? Emergence of applied stem cell and developmental biology.
- Wilkins, R., Browning, J., & Ellory, J. C. (2000). Surviving in a matrix: membrane transport in articular chondrocytes. *J Membr Biol*, 95-108.
- Williams, D. F. (1999). The Williams dictionary of biomaterials. Liverpool, United Kingdom: University Press.
- Yang, S., Leong, K. F., Du , Z., & Chua, C. K. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*, 79-89.

Zhao P, J. H. (2007). Biodegradable Fibrous Scaffolds Composed of Gelatin Coated Poly(E-Caprolactone) Prepared by Coaxial Electrospinning. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 372.

Zolnik, B. S. (2008). Evaluation of in vivo-in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres. *J Control Release*, 137-145.

## **ANEXOS**

## **Anexo 1: Reactivos utilizados en el laboratorio de ingeniería de tejidos**

### ***PBS***

El PBS es una solución tampón en la investigación biológica. Se encuentra como solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Mientras que los grupos fosfato mantienen el pH estable, la osmolaridad coincide con la del cuerpo humano (Fernández Díaz, 2013).

La adición de Anti-Anti (Antibióticos penicilina y estriptomina) al PBS para lavados tiene como finalidad evitar la contaminación bacteriana de los cultivos. La importancia del uso de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) durante el pasaje reside en su capacidad quelante, que secuestra al ión calcio, del cual depende la adherencia celular (Segretín).

### ***Dispasa***

La dispasa es una metaloproteasa neutral utilizada para recuperar células sin digerir uniones entre queratinocitos y de desprender células de forma grupal y no individual (Rendal Vázquez, y otros, 2013; López Obregón, 2013). La dispasa es más suave y efectiva que la tripsina, el colágeno u otras enzimas proteolíticas; no daña las células recolectadas y se puede usar para la disociación de tejido (Instrumentación Científico Técnica, 2015).

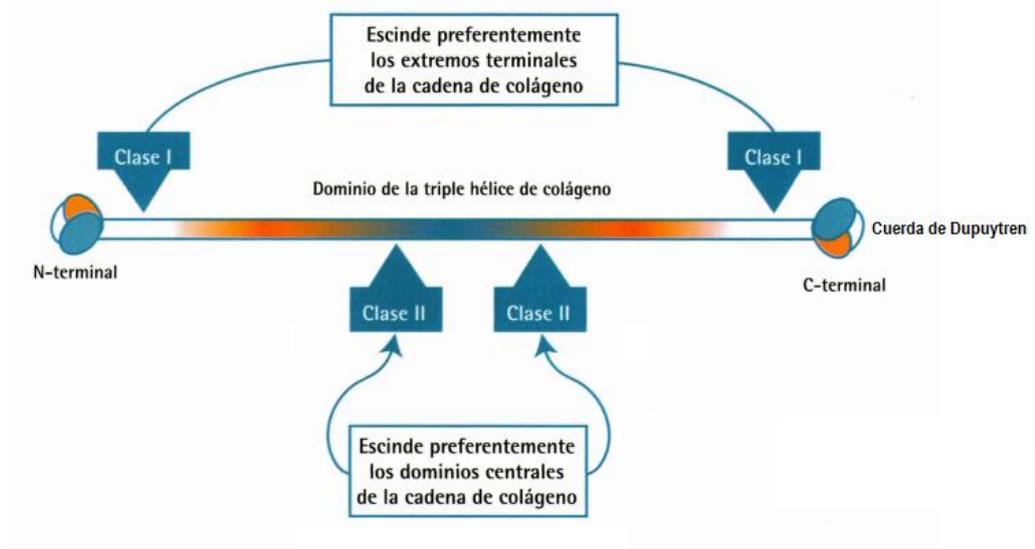
### ***Tripsina***

La tripsina es una proteasa, es decir, es capaz de los enlaces entre aminoácidos de las proteínas (The National Academies of Sciences, 2003). Durante un pasaje celular, la tripsina digiere a las proteínas que median la adhesión de las células al plato y entre ellas. Al final de su uso durante el procedimiento de pasaje celular, la tripsina es inactivada con medio de cultivo para evitar que esta dañe a las células (Segretín).

### ***Colagenasas***

Las colagenasas son proteínas que hidrolizan colágeno en condiciones fisiológicas, generando la rotura enzimática de las cuerdas de Dupuytren, compuestas principalmente de colágeno intersticial de tipos I y III, Las colagenasas dividen eficazmente el colágeno intersticial, pero en diferentes lugares de la molécula. Los estudios sugieren que tras la inyección las colagenasas actúan de forma sinérgica provocando la hidrólisis del colágeno, con lo que se debilita la cuerda contracturada y mejora la elasticidad y la movilidad (Figura 37).

Dentro del laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Hospital Infantil de México, Federico Gómez; se utiliza solo colagenasa clase I y II.



**Figura 37: Acción de la colagenasa clase I y II sobre la triple hélice de colágeno. Editada de “Colagenasa de Clostridium hitolyticum”, (Xiapex Pfizer, 2011)**

#### ***F12 suplementado con SFB al 10%, antibiótico-antimicótico***

Este medio se ha utilizado en diversos ensayos de mantenimiento celular para hepatocitos y epitelio de próstata de rata (Laboratorio Microvet, s.f.). Para este protocolo se utilizó medio F-12 nutrient mixure (HAM) que contiene 531.3 g/pkg de L-glutamina, no contiene bicarbonato de sodio, se maneja en un pH de 7.2, este es ajustado con HCl y se esteriliza por filtración (filtro de 0.2µm) (Alberts, y otros, 1989; Sigma-Aldrich, 2016). Finalmente se le adiciona el suero fetal bovino (SFB) y el antibiótico-antimicótico

La adición de Anti-Anti (Antibióticos penicilina y estreptomicina) tiene como finalidad evitar la contaminación bacteriana de los cultivos.

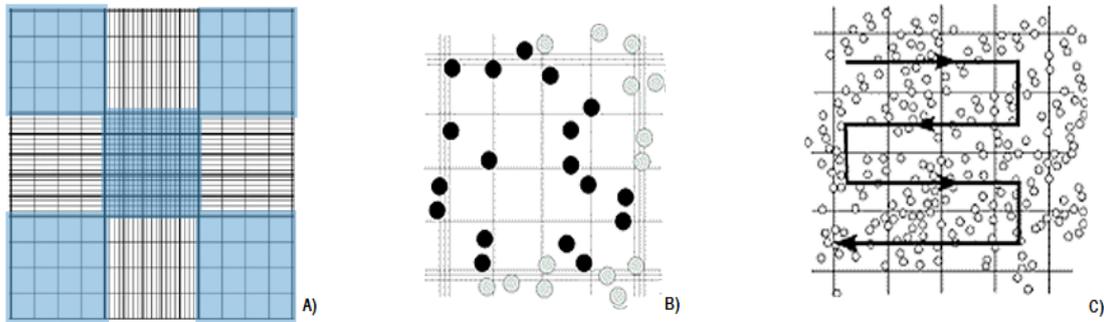
El SFB es un subproducto derivado del faenamiento de vacas preñadas. El SFB es el único medio universal aplicable para el cultivo y proliferación *in vitro* y en la producción biológica de células animales (Probiotek, 2014). Aunque la composición, los efectos y las interacciones exactas de todos los componentes de SFB tienen todavía que ser esclarecidas, los componentes principales pueden ser resumidos como sigue (QuimiNet, 2016):

- Proteínas necesarias para la adherencia de las células a la matriz de soporte

- Enzimas y Hormonas proteicas
- Factores específicos de promoción del desarrollo celular
- Factores de inhibición del desarrollo celular
- Hormonas no proteicas
- Lípidos esenciales para el desarrollo, diferenciación y multiplicación celular
- Minerales
- Metabolitos y nutrientes
- Sustancias con capacidad de tampón (buffer)
- Inhibidores de proteasas
- Ligantes
- Inactivantes de materiales tóxicos

*Anexo 2: Conteo celular con cámara de Neubauer*

El conteo celular comienza con la preparación de 1mL de una suspensión homogénea de células 1:10 con medio de cultivo, consecutivamente, esta preparación es mezclada con azul de tripán 1:2, con esta mezcla se carga la cámara de Neubauer (Figura 38).



**Figura 38: L cuenta se lleva a cabo en microscopio, enfocando la cuadrícula central.**  
**A) Las áreas marcadas en azul son aquellas que se utilizarán para llevar a cabo la cuenta.**  
**B) Sólo se contabilizan las células claras turgentes.**  
**C) Orden que debe llevar el recuento celular, en forma de greca.**

Para el cálculo de células se aplica la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Volumen [ml]}}$$

Donde el número de células son todas las contadas en los cuadros, el volumen se refiere al volumen total de los cuadros donde se hizo el recuento.

Como el volumen de 1 cuadro grande es:

$$0.1 \text{ cm} * 0.1 \text{ cm} = 0.01 \text{ cm}^2 \text{ de superficie}$$

$$0.01 \text{ cm}^2 \text{ de superficie} * 0.01 \text{ cm de profundidad} = 0.0001 \text{ cm}^3 = 0.0001 \text{ mL}$$

La fórmula para recuento con cuadros grandes en cámara de Neubauer es:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células} * 10,000}{\text{Número de cuadros}}$$

En el caso de que hayamos aplicado una dilución, deberemos transformar la concentración obtenida durante el recuento celular en la concentración de la muestra original.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células} * 10,000}{\text{Número de cuadros} * \text{Dilución}}$$

Con este método, existen un porcentaje de error del 20 al 30% debido al pipeteo, errores estadísticos por ser una muestra poco representativa entre otros (celeromics).

**Anexo 3: Memoria de cálculo "Preparación de disolución de anticuerpos"**

**Anticuerpo COL2A1 (M2139)**

1. Se definió la concentración de la dilución a utilizar y el volumen final de la misma, considerando que por cada pozo se agregarían 100  $\mu\text{L}$  de dilución y se utilizaría para 4 de los 8 pozos (Figura 33), por lo que el volumen final de cada dilución sería de 400  $\mu\text{L}$

Entonces:

$$\text{Presentación inicial: } 100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$\text{Dilución a utilizar: } 1: 100$$

$$\text{Concentración final} = \frac{\text{Presentación inicial}}{\text{Dilución a utilizar}}$$

$$\text{Concentración final} = \frac{100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{100} = 1 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

**La concentración final de la dilución fue 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$**

2. Para obtener el volumen del vial con anticuerpo a utilizar:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1 = \text{Concentración del vial}$

$C_2 = \text{Concentración deseada}$

$V_1 = \text{Volumen a tomar del vial}$

$V_2 = \text{Volumen final de la disolución}$

Entonces:

$$C_1 = 100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$C_2 = 1 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$V_2 = \frac{\left(1 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) (0.4 \text{ mL})}{100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}$$

$$V_2 = 400 \mu\text{L} = 0.4 \text{ mL}$$

$$V_2 = 0.004 \text{ mL} = 4\mu\text{L}$$

**Se utilizaron 4  $\mu\text{L}$  del vial de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$**

3. Para obtener el volumen de albúmina a utilizar:

$$V_{final} = V_{Ab} + V_{Alb}$$

Donde:

$V_{Ab}$   
= Volumen del vial de Anticuerpo

$V_{Alb}$  = Volúmen de albúmina

Entonces:

$$V_{final} = 400 \mu\text{L}$$

$$V_{Ab} = 4 \mu\text{L}$$

$$V_{final} - V_{Ab} = V_{Alb}$$

$$400 \mu\text{L} - 4\mu\text{L} = V_{Alb}$$

$$400 \mu\text{L} - 4\mu\text{L} = 396 \mu\text{L}$$

**Se adicionaron 396  $\mu\text{L}$  de albúmina**



**ANTI-COLLAGEN TYPE I MONOCLONAL ANTIBODY**  
**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

<b>CATALOG NUMBER:</b>	MAB3391	<b>QUANTITY:</b>	100 µg
<b>LOT NUMBER:</b>		<b>CONCENTRATION:</b>	1 mg/mL
<b>ALTERNATE NAMES:</b>	COL I	<b>EPITOPE:</b>	C-terminus 1a
<b>CLONE NAME:</b>	5D8-G9	<b>HOST/ISOTYPE:</b>	IgG1k
<b>BACKGROUND:</b>	Collagen occurs in many places throughout the body. The 29 types of collagen have thus far been identified and described in literature. Over 90% of the collagen in the body, however, are of type I, II, III, and IV. Collagen I is the most abundant collagene of the human or animal body. It is present in scar tissue, tendons, skin, artery walls, the endomysium of myofibrils, fibrocartilage, and the organic part of bones and teeth. Collagen I primary structure consists of a trimer of three interwound, self assembling chains. Two alpha-1 and one alpha-2 chains wound together is a long, fibrillar structure.		
<b>SPECIFICITY:</b>	Antibody is specific to collagen type I by immunoblotting when used after <u>non-denaturing acidic PAGE</u> . There is no evidence for cross reactivity with Collagen Types III, V and VI. The specificity towards collagen types and various connective tissues proteins was also examined by a standard ELISA and by a competitive ELISA. The antibody did not cross-react with the non-collagenous proteins human fibronectin, bovine elastin or mouse laminin. Examination of the antibody specificity by immunoblotting after SDS/PAGE gave no response indicating that the clone requires the native triple-helical conformation, and thus the clone will NOT work in traditional reduced westerns.		
<b>IMMUNOGEN:</b>	Purified human type I collagen emulsified win Freund's complete adjuvant.		
<b>APPLICATIONS:</b>	Immunohistochemistry: fresh frozen or acetone fixed sections only Native immunoblotting: see Ramshaw, J et al 1987 Electrophoresis and electroblotting of Native Collagens. Analytical Biochemistry 168:82-87 for method on native, acidic PAGE gels. Such gels are required for antibody reactivity in western blotting for this clone. ELISA: 10 µg/mL detection in direct ELISA. FACS : 1:100 per 10,000 cells {Harle J et al (2001) Ultrasound in Med. & Biol. 27(4):579-586.		
<b>SPECIES REACTIVITY:</b>	Human, Bovine, Ovine, Porcine, Caprine and Canine> Does not react with mouse, rat, guinea pig, squirrel, horse, kangaroo, or chicken collagen I proteins.		
<b>PRESENTATION:</b>	Protein G purified immunoglobulin in 50 mM Tris Acetate, 150 mM NaCl, 0.1% Bronidox.		
<b>STORAGE/HANDLING:</b>	Store antibody in aliquots, tightly sealed at 2° to 8° C; avoid multiple warm and chill cycles. Store product up to expiration date on vial label.		

Unless otherwise stated in our catalog or other company documentation accompanying the product(s), our products are intended for research use only and are not to be used for any other purpose, which includes but is not limited to, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses or any type of consumption or application to humans or animals.

©2002 - 2009: Millipore Corporation. All rights reserved. No part of these works may be reproduced in any form without permission in writing.

28820 Single Oak Drive • Temecula, CA 92590  
 Technical Support: T: 1-800-MILLIPORE (1-800-645-5476) • F: 1-800-437-7502  
 www.millipore.com



**REFERENCES:**

Werkmeister JA, Peters DE and Ramshaw JA. Development of monoclonal antibodies to collagens for assessing host-implant interactions. *J Biomed Mater Res Applied Biomaterials* 1989;23(A3):273-83.

Werkmeister JA and Ramshaw JA. The use of immunohistology in studies on connective tissue organisation in hides and skins. *Das Leder* 1988;39:145-51.

Werkmeister JA and Ramshaw JA. Monoclonal antibodies to collagens for immunofluorescent examination of human skin. *Acta Derm* 1989;69:399-402.

Ramshaw, J.A. and Werkmeister, J.A. Electrophoretic and electroblotting of native collagens. *Anal. Biochem.* 1988;168:82-87.

Werkmeister JA, Ramshaw JA and Ellender G. Characterisation of a monoclonal antibody against native human Type I Collagen. *Eur J Biochem* 1990;187:439-43.

Mehlhorn, AT et al (2009) Chondrogenesis of Adipose-derived adult stemm cells in a polylactide-Co-Glycolide Scaffold. *Tissue Engineering Part A.* 15(5):1159-1167.

Johnson, P et al (2000) The production of Extracellular Matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture. *Am J Respir. Crit. Care Med.* 162(6):2145-2151.

FOR RESEARCH USE ONLY; NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES. NOT FOR HUMAN OR ANIMAL CONSUMPTION

**Important Note:** *During shipment, small volumes of product will occasionally become entrapped in the seal of the product vial. For products with volumes of 200  $\mu$ L or less, we recommend gently tapping the vial on a hard surface or briefly centrifuging the vial in a tabletop centrifuge to dislodge any liquid in the container's cap.*

Unless otherwise stated in our catalog or other company documentation accompanying the product(s), our products are intended for research use only and are not to be used for any other purpose, which includes but is not limited to, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses or any type of consumption or application to humans or animals.

©2002 - 2009: Millipore Corporation. All rights reserved. No part of these works may be reproduced in any form without permission in writing.

28820 Single Oak Drive • Temecula, CA 92590  
Technical Support: T: 1-800-MILLIPORE (1-800-645-5476) • F: 1-800-437-7502  
[www.millipore.com](http://www.millipore.com)

## COL2A1 (M2139): sc-52658

### BACKGROUND

The extensive family of COL gene products (collagens) is composed of several chain types, including fibril-forming interstitial collagens (types I, II, III and V) and basement membrane collagens (type IV), each type containing multiple isoforms. Collagens are fibrous, extracellular matrix proteins with high tensile strength and are the major components of connective tissue, such as tendons and cartilage. All collagens contain a triple helix domain and frequently show lateral self-association in order to form complex connective tissues. Several collagens also play a role in cell adhesion, important for maintaining normal tissue architecture and function. In cartilage, Collagen Type II constitutes the bulk of the fibril. Sensitization with Collagen Type II induces an erosive polyarthritis in rats, mice and higher primates which can resemble rheumatoid arthritis and relapsing polychondritis.

### REFERENCES

- Bateman, J.F., et al. 1996. Collagen superfamily. In Comper, W.D., ed. *Extracellular Matrix, Vol 2: Molecular Components and Interactions*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 22-67.
- McCarthy, J.B., et al. 1996. Cell adhesion to collagenous matrices. *Biopolymers* 40: 371-381.

### CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: COL2A1 (human) mapping to 12q13.11; Col2a1 (mouse) mapping to 15 F1.

### SOURCE

COL2A1 (M2139) is a mouse monoclonal antibody raised against the collagen II J1 epitope (triple helical position 551-564) of mouse origin.

### PRODUCT

Each vial contains 100 µg IgG<sub>2b</sub> in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

### APPLICATIONS

COL2A1 (M2139) is recommended for detection of Collagen Type II of mouse, rat, human and avian origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1-2 µg per 100-500 µg of total protein (1 ml of cell lysate)], immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and immunohistochemistry (including paraffin-embedded sections) (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500).

COL2A1 (M2139) is also recommended for detection of Collagen Type II in additional species, including bovine.

Suitable for use as control antibody for COL2A1 siRNA (h): sc-35081, COL2A1 siRNA (m): sc-35082, COL2A1 shRNA Plasmid (h): sc-35081-SH, COL2A1 shRNA Plasmid (m): sc-35082-SH, COL2A1 shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-35081-V and COL2A1 shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-35082-V.

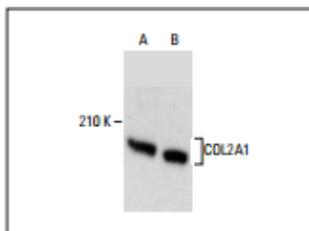
Molecular Weight of COL2A1: 190 kDa.

Positive Controls: HISM cell lysate: sc-2229, CCD-1064Sk cell lysate: sc-2263 or ECV304 cell lysate: sc-2269.

### STORAGE

Store at 4° C, **\*\*DO NOT FREEZE\*\***. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

### DATA



COL2A1 (M2139): sc-52658. Western blot analysis of COL2A1 expression in HISM (A) and CCD-1064Sk (B) whole cell lysates.

### SELECT PRODUCT CITATIONS

- Matsumura, K., et al. 2010. Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell cryopreservation. *Cell Transplant.* 19: 691-699.
- García, M.A., et al. 2011. The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil promotes PKR-mediated apoptosis in a p53-independent manner in colon and breast cancer cells. *PLoS ONE* 6: e23887.
- Lacerda, C.M., et al. 2012. Static and cyclic tensile strain induce myxomatous effector proteins and serotonin in canine mitral valves. *J. Vet. Cardiol.* 14: 223-230.
- Stacey, M., et al. 2013. Atomic force microscopy characterization of collagen "nanostraws" in human costal cartilage. *Micron* 44: 483-487.
- López-Ruiz, E., et al. 2013. Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 246-258.
- Lecointre, M., et al. 2014. The efficiency of glutamate uptake differs between neonatal and adult cortical microvascular endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34: 764-747.
- Cao, B., et al. 2014. Effects of spreading areas and aspect ratios of single cells on dedifferentiation of chondrocytes. *Biomaterials* 35: 6871-6881.
- Du, G., et al. 2015. Osthole inhibits proliferation and induces catabolism in rat chondrocytes and cartilage tissue. *Cell. Physiol. Biochem.* 36: 2480-2493.

### RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

### PROTOCOLS

See our web site at [www.scbt.com](http://www.scbt.com) or our catalog for detailed protocols and support products.

**Anexo 5: Memoria de cálculo "Prueba de viabilidad por el método de MTT"**

1. Se obtuvieron las lecturas a 540 nm en el siguiente orden (Tabla 8Tabla 9):

**Tabla 8: Orden de muestras en la placa "96-Wells-COSTAR-3596" para lectura.**

\*Ctrl (-) = control negativo del polímero

\*M#=muestra del conejo número

\*c/a= con agrecano

\*s/a= sin agrecano

	1	2	3	4	5
A	Blanco	Ctrl (-) c/a	M1 c/a	Ctrl (-) s/a	M1 s/a
B	Blanco	Ctrl (-) c/a	M2 c/a	Ctrl (-) s/a	M2 s/a
C	Blanco		M3 c/a		M3 s/a

**Tabla 9: Lecturas obtenidas con el lector de ELISA a 540nm**

	1	2	3	4	5
A	0.097	0.237	1.452	0.294	1.157
B	0.096	0.203	1.361	0.244	1.138
C	0.096		1.391		1.211

2. Se obtuvo el promedio de las lecturas de "Blanco"

$$Blanco_{promedio} = \frac{\sum_1^n Blanco}{n}$$

$$Blanco_{promedio} = \frac{0.097 + 0.096 + 0.096}{3}$$

$$Blanco_{promedio} = 0.096$$

3. A cada lectura se le restó el valor de "Blanco promedio", obteniendo los resultados en la Tabla 10:

**Tabla 10: Lecturas de MTT considerando el valor de "Blanco promedio"**

	2	3	4	5
A	0.141	1.356	0.198	1.061
B	0.107	1.265	0.148	1.042
C		1.295		1.115

p.ej. para la muestra del conejo 1 en polímero con agrecano:

$$Muestra_{real} = Muestra - Blanco_{promedio}$$

$$Muestra_{real} 1 \frac{c}{a} = 1.452 - 0.096$$

$$Muestra_{real} 1 \frac{c}{a} = 1.356$$

4. Se obtuvo el promedio de cada muestra y de cada control, estos valores fueron utilizados para la elaboración del gráfico.

p.ej. para las muestras en polímero con agrecano:

$$M c/a_{promedio} = \frac{M1 \frac{c}{a} + M2 \frac{c}{a} + M3 \frac{c}{a}}{3}$$

$$M1 c/a_{promedio} = \frac{1.356 + 1.265 + 1.295}{3}$$

$$M1 c/a_{promedio} = 1.305$$

5. Se obtuvo la desviación estándar de cada muestra y control estos valores fueron utilizados para la elaboración del gráfico.:

p.ej. para las muestras en polímero con agrecano:

$$\sigma_{M c/a} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left( M_i \frac{c}{a} - M1 \frac{c}{a_{promedio}} \right)^2}{n}}$$

$$\sigma_{M c/a} = \sqrt{\frac{(1.356 - 1.305)^2 + (1.265 - 1.305)^2 + (1.295 - 1.305)^2}{3}}$$

$$\sigma_{M c/a} = 0.046$$

6. Se obtuvo el coeficiente de variación de las muestras.

p.ej. para las muestras en polímero con agrecano:

$$CV\% = \frac{\sigma}{M \frac{c}{a_{promedio}}} * 100$$

$$CV\% = \frac{0.046}{1.305} * 100$$

$$CV\% = 3.5\%$$



