

## Resumen

El cartílago articular es un tejido conectivo compuesto por condrocitos rodeados por una densa matriz extracelular (MEC). La MEC se compone principalmente de fibras de colágeno tipo II y de proteoglicanos (mayoritariamente agreganos). La función principal del cartílago articular es proporcionar una superficie lubricada para las articulaciones.

Las lesiones en el cartílago articular son comunes y pueden derivar a osteoartritis. El cartílago articular no tiene vasos sanguíneos, nervios o vasos linfáticos y, por tanto, tiene una capacidad limitada de auto-reparación.

La ingeniería tisular (IT) es un área científica multidisciplinar muy prometedora en la regeneración de las lesiones del cartílago. En la IT se utilizan en “andamiajes” (*scaffolds* en inglés) tridimensionales (3D) como soportes para el cultivo celular y tisular. Dichos *scaffolds*, en el caso de la IT del cartílago articular, tratan de proporcionar una estructura que facilite la adhesión y la expansión de los condrocitos, manteniendo un fenotipo condrocítico limitando su desdiferenciación; que es el mayor problema en los sistemas bidimensionales (2D).

Gran variedad de materiales están siendo probados como *scaffolds* para el trasplante de condrocitos en el cartílago lesionado. La adhesión celular a los *scaffolds* depende de las características físicas y químicas de su superficie. Características del material como la morfología de la superficie, la rigidez, el contenido de agua en equilibrio, la tensión superficial, la hidrofiliidad y la presencia de cargas eléctricas, influyen en la adhesión y la viabilidad celular.

El objetivo general de esta tesis fue estudiar la influencia de diferentes tipos de biomateriales (principalmente *scaffolds* pero también soportes 2D) en la respuesta de los condrocitos en cultivo *in vitro*. Las variables estudiadas incluyen la adhesión y viabilidad celular, así como la proliferación, la diferenciación de los condrocitos y síntesis de matriz extracelular.

Los *scaffolds* deben tener una estructura porosa interconectada con el fin de permitir el desarrollo celular a través de toda la estructura 3D. Además, los *scaffolds*, deben potenciar que los condrocitos mantengan su fenotipo así como permitir la entrada y salida de nutrientes y eliminación de desechos metabólicos.

Por todo ello, en este trabajo se ha estudiado el efecto de la hidrofiliidad y de la arquitectura de poro de los *scaffolds*. Se sintetizaron una serie de sustratos poliméricos de hidrofiliidad variable y se evaluó la respuesta biológica en cultivo en monocapa. Se cuantificó la viabilidad celular, la proliferación y la expresión de agregano. Cuando los condrocitos humanos se cultivaron en sustratos poliméricos en el que los grupos hidrófilos se distribuyeron de manera homogénea, la adhesión, la proliferación y la viabilidad disminuyó monótonamente con el

contenido de grupos hidrófilo de la cadena polimérica. Sin embargo, los copolímeros en los que los dominios hidrófilos e hidrófobos se alternaban mostraron mejores resultados que los homopolímeros correspondientes.

Para completar el estudio anterior, se sintetizaron series de *scaffolds* acrílicos bioestables así como series de *scaffolds* biodegradables con diferente hidrofiliidad y porosidad. Para ello, se utilizó una plantilla de microesferas sinterizadas (de polimetilmetacrilato, PMMA, o de polietilmetacrilato, PEMA) de tamaño controlado para obtener la estructura porosa interconectada. Esta técnica permite tanto el control del tamaño del poro como de su interconectividad. Se obtuvieron arquitecturas de poros regulares y reproducibles. El comportamiento mecánico de las muestras porosas fue significativamente diferente de las muestras de material no poroso de la misma composición. Las células colonizaron el *scaffold* en su totalidad cuando los poros y la interconexión entre los mismos era lo suficientemente grande.

Otro de los objetivos fue evaluar la rediferenciación condrogénica de condrocitos autólogos humanos, previamente expandidos en monocapa, sembrados en un *scaffold* biodegradable de policaprolactona (PCL). Este estudio demostró que los condrocitos cultivados en *scaffolds* de PCL con medio sin suero bovino fetal (FBS) (suplementado con insulina-transferrina-selenio (ITS) y ascorbato), se rediferenciaban de manera eficiente; expresando un fenotipo condrocítico, caracterizado por su capacidad de sintetizar proteínas de la MEC específicas de cartílago hialino.

Se estudió también la influencia de la hidrofiliidad y la conectividad de los poros de los *scaffolds* de caprolactona sobre la adhesión de los condrocitos a las paredes de los poros, su capacidad proliferativa y la composición de la MEC sintetizada. Se prepararon dos series de *scaffolds* basados en la PCL: en una de las series variando la porosidad y en la otra creando copolímeros en los que la relación de componente hidrófilo / hidrófobo variaba. Se observó de manera clara que el número de células aumentaba a medida que se aumentaba la porosidad del *scaffold*. Se comprobó que un mínimo de 70% de porosidad parece ser necesario para permitir la siembra de los condrocitos en el *scaffold* y su posterior viabilidad en el interior del mismo. Los resultados sugieren que parte de las células que se adherían a las paredes internas de los poros mantenían el fenotipo desdiferenciado de condrocitos cultivados en monocapa, mientras que otros se rediferenciaban.

En conclusión, los resultados de esta tesis aportan un avance en el campo de la regeneración de cartílago articular utilizando técnicas de IT. Los estudios realizados proporcionan directrices sobre la composición, la porosidad y la hidrofiliidad más adecuada para la óptima producción de cartílago hialino con la utilización de *scaffolds*, para su futuro uso en el trasplante autólogo de condrocitos en pacientes.