

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 933 738**

21 Número de solicitud: 202130097

51 Int. Cl.:

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61F 2/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

08.02.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.02.2023

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (94.0%)
Avda del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES y
UNIVERSIDAD DE JAÉN (6.0%)

72 Inventor/es:

MARCHAL CORRALES, Juan Antonio;
ANTICH ACEDO, Cristina;
JIMÉNEZ GONZÁLEZ, Gema;
CHOCARRO WRONA, Carlos;
LÓPEZ DE ANDRÉS, Julia;
VOLTES MARTÍNEZ, Ana y
LÓPEZ RUIZ, Elena

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **HIDROGEL BASADO EN MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA Y SUS USOS**

57 Resumen:

Hidrogel basado en matriz extracelular
descelularizada y sus usos.

La invención se refiere a un hidrogel biomimético de
matriz extracelular descelularizada derivada de
células madre mesenquimales, matriz extracelular
descelularizada derivada de células madre
mesenquimales diferenciadas a adipocitos,
fibroblastos, condrocitos y osteoblastos, y matriz
extracelular descelularizada derivada de fibroblastos
cultivados, a composiciones que contienen dicho
hidrogel, a métodos para producir dicho hidrogel y a
sus usos médicos y de investigación preclínica.

ES 2 933 738 A1

DESCRIPCIÓN

HIDROGEL BASADO EN MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA Y SUS USOS

5 La invención se refiere a un hidrogel biomimético a partir de matriz extracelular descelularizada, a composiciones que contienen dicho hidrogel, a métodos para producir dicho hidrogel y a sus usos médicos. La invención pertenece al campo técnico de los biomateriales, particularmente a la ingeniería de tejidos.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

El cartílago articular (CA) es un tejido conectivo especializado que desarrolla importantes funciones relacionadas con la conservación y la posibilitación de la locomoción. Debido a su estructura y fisiología avascular, el cartílago tiene una capacidad de reparación intrínseca
 15 limitada cuando se lesiona, una afección que con frecuencia da como resultado enfermedades degenerativas tales como la osteoartritis (OA) (*Ryu J., et al, 1984, Arthritis Rheum.*, 27, 49).

Para promover la regeneración del cartílago, las estrategias de ingeniería de tejidos (IT) han
 20 supuesto un paso adelante, proporcionando biomateriales como armazones en los que pueden colocarse células para producir localmente nuevos tejidos similares al cartílago (*Armiento A. R., et al, 2018, Acta Biomater.*, 65, 1). Entre los biomateriales de armazón, los hidrogeles inyectables han recibido mucha atención no solo por sus propiedades biológicas y fisicoquímicas excepcionales (por ejemplo, citocompatibilidad, alta retención de agua,
 25 permeabilidad y propiedades mecánicas ajustables) sino también por su capacidad para rellenar cualquier herida con forma (*Jooybar E., et al, 2019, Acta Biomater.*, 83, 233).

Tomando como inspiración la matriz extracelular (MEC), que desempeña una función importante no sólo como soporte mecánico, sino también como regulador funcional clave
 30 para la maduración tisular, se han realizado esfuerzos considerables para desarrollar hidrogeles que recreen la composición o las propiedades del cartílago articular nativo para guiar la formación específica de tejidos (*Luo Y., et al, 2019, J Biomed. Mater. Res. Parte B Appl. Biomater.*, 107, 1695).

35 Las lesiones óseas son trastornos comunes que afectan a personas de todas las edades; en el caso de las lesiones del cartílago de la rodilla, a medida que la lesión del cartílago progresa, se extiende al hueso subcondral subyacente y aparece un defecto osteocondral (*Jiménez G., et al, 2018, J Adv Exp Med Biol.*, 1059: 63-83)). Los enfoques clínicos actuales

para la reparación de defectos articulares no son totalmente satisfactorios debido a la mala calidad del tejido recién formado y a la falta de integración (López-Ruiz E., et al, 2018, *Eur Cell Mater.*, 35: 209-224). Gracias a la ingeniería de tejidos en las últimas décadas se han desarrollado diferentes construcciones para este tipo de lesiones, pero estos productos aún

5 no son capaces de imitar todas las características del cartílago y el hueso, principalmente debido a limitaciones tecnológicas para producir estructuras biomiméticas compuestas por materiales con diversas propiedades y que permitan la disposición espacial de las células para su correcta integración. Para favorecer la regeneración del tejido óseo, la técnica conocida como bioimpresión 3D se presenta como una alternativa para la fabricación de

10 soportes formados por diversos biomateriales y diferentes tipos de células distribuidas de manera personalizada, estructurada y definida espacialmente. Por tanto, para la creación de construcciones para lesiones óseas, es importante la creación de biotintas y la combinación de materiales que imiten las propiedades estructurales, físicas y biológicas del hueso. Estos materiales deben ser bioactivos, biocompatibles, biodegradables y deben proporcionar

15 señales para la diferenciación y la proliferación (López-Ruiz E., et al, 2016, *Expert Opin Ther Pat.* 26 (8): 877-90).

La piel es uno de los órganos más grandes del cuerpo, comprendiendo el 15 % del peso corporal total de los adultos, este órgano desempeña una función vital en el mantenimiento

20 de la homeostasis del cuerpo, ya que protege los órganos internos de posibles amenazas químicas, biológicas y físicas. Además, ejerce muchas otras funciones, tales como la prevención de la pérdida excesiva de agua, la termorregulación, la excreción y la percepción a través de receptores especializados (Kanitakis J., et al, 2002, *Eur J Dermatology.* 12(4): 390–401; Kolarsick, P. A. J. y Kolarsick MA. 2001, *Journal of the Dermatology Nurses' Association.* págs. 203-13; Sontheimer RD. 2014, *Journal of Investigative Dermatology.* Nature Publishing Group. 134, págs. 581–2). Las enfermedades relacionadas con la piel pueden deberse a varias razones: heridas agudas o crónicas, patologías relacionadas con la piel (tales como úlceras del pie diabético), fístulas perianales, epidermólisis bullosa o la causa más común de pérdida de piel importante, el traumatismo térmico. Los traumatismos

30 dérmicos profundos y las heridas cutáneas de espesor total con frecuencia son difíciles de tratar debido al alto riesgo de infección, la importancia del área implicada y el daño potencial de capas más profundas de la piel, incluyendo la dermis. Un enfoque típico para el tratamiento de lesiones cutáneas graves es reemplazar el tejido perdido por un autoinjerto, un aloinjerto o un xenoinjerto. A pesar de ello, estas soluciones presentan dos grandes

35 inconvenientes: la disponibilidad de donantes y, especialmente, las heridas grandes, donde ninguno de estos enfoques es factible (Vrana NE, et al. 2013, *Tissue Engineering - Parte B: Reviews.* 19, págs. 529–43; Santema TB, et al. 2016, *Cochrane Database of Systematic Reviews.* Vol 2016). Para superar estas limitaciones, es necesario desarrollar sustitutos

cutáneos, en los que la ingeniería de tejidos (IT) es una alternativa prometedora para satisfacer la creciente demanda de sustitutos cutáneos. Como resultado de sus propiedades excepcionales, tales como la alta capacidad de almacenamiento de agua, las características mecánicas y la biocompatibilidad, los hidrogeles se consideran la opción más favorable para su aplicación como apósitos para heridas en comparación con otras alternativas. Por ejemplo, los hidrogeles tienen un gran potencial debido a su red 3D intrínseca, que imita la estructura nativa de la MEC, proporcionando soporte mecánico y porosidad. Asimismo, muestran una capacidad de interacción celular inherente. Actualmente, en la práctica clínica, el uso de autoinjertos es el tratamiento de referencia. No obstante, la disponibilidad de tejidos de donantes sanos es limitada en pacientes con pérdidas graves de tejido. Para superar esta limitación, se están desarrollando sustitutos cutáneos modificados por ingeniería tisular para ofrecer tratamientos alternativos para la curación de heridas.

En la actualidad, la MEC descelularizada derivada de tejido (MECd-t) se considera un biomaterial prometedor, puesto que es una forma directa de proporcionar la composición compleja del tejido nativo, que es difícil de reproducir usando biomateriales comunes. Sin embargo, todavía existen algunos retos y problemas que son necesarios abordar. Por ejemplo, la disponibilidad limitada de tejido de donante cuando la fuente de MECd-t es autóloga, el riesgo potencial de aumento de la inmunogenicidad y la transmisión de patógenos si es alógena o los protocolos a largo plazo para su descelularización total (Zhang W., et al, 2016, *Tissue Eng.- Parte B Rev.*, 22, 193).

Recientemente, el cultivo de células ha surgido como una fuente alternativa de MECd para la IT. La matriz derivada de células (MECd-c) es también una matriz funcional que contiene una mezcla compleja de macromoléculas y factores de señalización que pueden parecerse al microambiente tisular nativo. En comparación con la MECd-t, esta MEC derivada de células ofrece algunas ventajas, tales como su producción a gran escala y su personalización fácil a través del uso de diferentes tipos celulares o condiciones de cultivo, además de la excelente biocompatibilidad y propiedades bioinductivas (Cai R., et al, 2015, *Biomaterials*, 52, 199).

Son necesarios armazones o matrices para el tratamiento de defectos de cartílago, hueso y piel que reproduzcan incluso mejor el microambiente dinámicamente cambiante sostenido por la MEC durante el desarrollo tisular, sin factores de crecimiento exógenos, proporcionando un producto más fácilmente traducible que la MEC derivada de tejidos xenógenos y evitando la cirugía invasiva.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un hidrogel basado en matriz extracelular descelularizada (MECd) derivada de células madre mesenquimales cultivadas (MECdm) que promueve la condrogénesis y la regeneración del cartílago sin factores de crecimiento exógenos, proporcionando un hidrogel de MECdm biomimético inyectable para ingeniería de tejidos.

5 Particularmente, la presente invención se refiere a un hidrogel a base de matriz extracelular descelularizada (MECd) derivada de células madre mesenquimales (CMM) diferenciadas (MECdmd), preferiblemente de células madre mesenquimales condrogénicas tempranas cultivadas (MECdmc) y de células madre mesenquimales diferenciadas a adipocitos cultivadas (MECda), fibroblastos (MECdff) y osteoblastos (MECdo) o matriz extracelular
10 descelularizada derivada de fibroblastos cultivados (MECdf).

Los inventores han desarrollado nuevos hidrogeles biomiméticos que proporcionan un entorno favorable para las células con propiedades fisicoquímicas y biológicas adecuadas y promueven la regeneración específica de tejido cartilaginoso, óseo y cutáneo, *in vivo* o *in*
15 *vitro*, sustentando todos ellos una viabilidad celular alta a diferentes concentraciones de MECd.

Los inventores han sembrado CMM humanas de tejido adiposo en condiciones específicas de cultivo para generar MECd condrogénicas tempranas, osteogénicas, fibroblásticas y
20 adipogénicas y han sembrado FB humanos de tejido dérmico para generar MECdf. Al final del período de cultivo, las células se retiraron de la matriz subyacente mediante exposición a un tratamiento de descelularización.

La descelularización de las MECd se evaluó mediante la medición del contenido de ADN y
25 los análisis de composición. La composición, determinada mediante técnicas cuantitativas, histológicas y de espectrometría de masas, comprende la expresión de los componentes principales del tejido nativo, el colágeno de tipo II y los GAG, así como proteínas tales como fibronectina, colágeno de tipo I, versicano o tenascina-C. Por medio de la espectrometría de masas, los inventores han identificado otros componentes que constituyen esta matriz rica y
30 compleja, incluyendo proteínas estructurales tales como la familia fibrilar y colágenos asociados (de tipo III, IV, V, VIII, XII), proteoglicanos y glicoproteínas, que confieren propiedades mecánicas y adhesión celular, así como proteínas afiliadas que contribuyen a la función y la dinámica de la MEC y factores de señalización.

35 Además, los inventores realizaron ensayos de biocompatibilidad *in vivo* en ratones CD1 inmunocompetentes (ICR). Los resultados mostraron que la MECdm condrogénica temprana posee una biocompatibilidad excelente y propiedades fisicoquímicas y mecánicas adecuadas para su inyectabilidad, es capaz de inducir la condrogénesis de CMM sin

factores complementarios y, además, de formar un tejido similar al cartílago hialino después de su implantación *in vivo*. Estos resultados demuestran el potencial de este hidrogel basado en MECdm condrogénica temprana para aplicaciones en la regeneración de tejidos, particularmente la reparación y la regeneración del cartílago. Los inventores observaron estos efectos mediante un aumento de marcadores específicos de cartílago, tanto a nivel genético (genes COL2A1, ACAN y SOX9) como proteínico (colágeno de tipo II y proteoglicanos) usando qPCR y técnicas histológicas, respectivamente. Los ensayos reológicos demostraron que el hidrogel de MECdm condrogénica temprana a ambas concentraciones tiene propiedades adecuadas para su uso como un hidrogel inyectable no solo para la reparación local del cartílago, sino también para el desarrollo de sustitutos biomiméticos similares al cartílago mediante bioimpresión 3D.

Así pues, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un hidrogel biomimético que comprende una matriz extracelular descelularizada derivada de células madre mesenquimales diferenciadas (MECdm), de aquí en adelante en el presente documento, el hidrogel de la invención.

El término "hidrogel" utilizado en el presente documento se refiere a una red o armazón 3D de mezcla de materiales, moléculas, polímeros o sustancias que se combinan mediante enlaces químicos, incluyendo enlaces covalentes, iónicos y supramoleculares, o mediante cualquier combinación de los mismos, para formar estructuras hinchables en agua pero insolubles en agua con una textura sólida, semisólida o semilíquida, que se usan como armazón de ingeniería de tejidos. Preferentemente, el hidrogel es un hidrogel biomimético. La expresión "hidrogel biomimético" utilizado en el presente documento se refiere a un hidrogel o armazón que imita el microambiente extracelular natural para facilitar la interacción entre los hidrogeles y las células circundantes a través de reconocimiento molecular, y potenciar adicionalmente la respuesta celular específica y la regeneración tisular.

El hidrogel de la invención se basa en la matriz extracelular (MEC). Las expresiones "matriz extracelular" o "MEC", como se usan en el presente documento, se refieren a un armazón natural o artificial para el crecimiento celular que proporciona un microambiente para la comunicación célula/célula, el crecimiento celular y la remodelación tisular, particularmente tres biofunciones básicas, incluyendo la adhesión celular, la degradación proteolítica y la unión a GF. Las MEC naturales, las MEC que se encuentran en organismos multicelulares, tales como, pero sin limitación, mamíferos y seres humanos, son mezclas complejas de biomoléculas estructurales y no estructurales, incluyendo, pero sin limitación, colágenos, elastinas, lamininas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, antimicrobianos,

quimioatrayentes, citocinas y factores de crecimiento. La composición y la estructura de las MEC varían dependiendo de la fuente del tejido.

Particularmente, el hidrogel de la invención comprende una matriz extracelular
5 descelularizada. Las expresiones "matriz extracelular descelularizada" o "MECd" utilizadas
en el presente documento se refieren a una MEC en donde se han retirado sustancialmente
las células endógenas (fracciones o componentes celulares) conservando al mismo tiempo
sus propiedades estructurales y de composición, tejido u órgano nativos, proporcionando de
este modo microambientes específicos de tejido u órgano para el crecimiento y la función
10 celulares. Preferentemente, la MEC descelularizada se aísla o se separa de al menos
aproximadamente el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 99 %), o más, de material
celular endógeno. La presencia o la extensión del material celular endógeno puede
determinarse usando cualquier método conocido en el estado de la técnica, por ejemplo,
transferencia Western, detección de núcleos, microscopía, etc.

15 Como sabe un experto en la materia, el procedimiento de descelularización implica la lisis
celular seguida de la separación de las células de la MEC. Durante la descelularización se
usan varios métodos físicos, químicos y biológicos, y la elección de cuál usar depende de
varios factores, tales como el espesor, la densidad y también el contenido lipídico del tejido y
20 del órgano.

En la presente invención, la matriz extracelular descelularizada (MECd) deriva de células
madre mesenquimales diferenciadas o "MECdmd". La expresión "células madre
mesenquimales" o "CMM" se refiere a células estromales multipotentes que pueden
25 diferenciarse en una diversidad de tipos celulares, incluyendo osteoblastos (células óseas),
condrocitos (células cartilaginosas), miocitos (células musculares), fibroblastos y adipocitos.
En la presente invención, la expresión "células madre mesenquimales diferenciadas"
(CMMd) se refiere a células madre mesenquimales parcial o totalmente diferenciadas, es
decir, células de diferentes estadios de diferenciación o de especialización. La
30 diferenciación, proliferación, especialización implica una sucesión de alteraciones en la
morfología celular, el potencial de membrana, la actividad metabólica y la sensibilidad a
señales.

La obtención de células madre mesenquimales de un sujeto, preferentemente un mamífero,
35 más preferentemente un ser humano, es una práctica habitual para un experto en la materia.

Los términos "paciente" "sujeto" o "individuo" se usan indistintamente y se refieren a un
mamífero, por ejemplo, un ser humano o un mamífero no humano, incluyendo primates (por

ejemplo, macaco, *Pan troglodytes*, *Pongo*), un mamífero domesticado (por ejemplo, félidos, cánidos), un mamífero agrícola (por ejemplo, bovino, ovino, porcino, equino) y un mamífero o roedor de laboratorio (por ejemplo, *Rattus*, murino, lagomorfo, hámster).

- 5 En una realización preferida de la invención, las células madre mesenquimales son células madre mesenquimales de mamíferos, preferentemente células madre mesenquimales humanas (CMMh).

10 Las CMM pueden aislarse de tejidos de médula ósea, placenta, sangre del cordón umbilical, tejido adiposo, músculo adulto, estroma corneal, líquido amniótico, endometrio y dientes. En otra realización preferida de la invención las células madre mesenquimales se aíslan de tejido adiposo.

15 Como se ha descrito anteriormente, la matriz extracelular descelularizada (MECd) deriva de células madre mesenquimales diferenciadas (MECdmd). En una realización preferida de la invención, las células madre mesenquimales diferenciadas se seleccionan entre la lista que consiste en: células madre mesenquimales condrogénicas tempranas, adipocitos, fibroblastos y osteoblastos.

20 La expresión "células madre mesenquimales condrogénicas tempranas" utilizada en el presente documento se refiere a células madre que están en el proceso de diferenciación de células madre mesenquimales a condrocitos, es decir, condrocitos de etapas tempranas de la condrogénesis. La matriz de la etapa temprana contiene elementos y factores que no están presentes en la madura. Específicamente, la matriz condrogénica temprana que
25 consiste en la expresión inicial de los principales componentes del tejido cartilaginoso maduro (colágeno de tipo II y GAG), así como proteínas que se han relacionado con las primeras etapas de la condrogénesis (es decir, fibronectina, colágeno de tipo I, versicano o tenascina-C).

30 El término "adipocitos" utilizado en el presente documento se refiere a células que constituyen el tejido adiposo. Son células redondeadas, de 10 a 200 micrómetros, con un contenido lipídico que representa el 95 % de la masa celular y que forma el elemento constitutivo del tejido graso. Su característica fundamental es que almacenan una gran cantidad de grasas (triglicéridos), que, en el caso de los adipocitos, el tejido adiposo blanco
35 (el más abundante en el cuerpo humano adulto), se agrupan entre sí formando una gota grande que ocupa la mayor parte de la célula.

El término "fibroblastos" utilizado en el presente documento se refiere a un tipo celular

residente del tejido conectivo. Sintetiza fibras y mantiene la matriz extracelular de los tejidos en muchos animales. Estas células proporcionan una estructura similar a una red (estroma) a muchos tejidos diferentes y desempeñan una función crucial en la curación de heridas, siendo las células más comunes del tejido conectivo. Derivan de células mesenquimales y pluripotenciales primitivas. Las células estromales que pueden transformarse en fibroblastos, osteoblastos, adipocitos y células musculares se identifican en cultivos de médula ósea como células adherentes.

El término "osteoblastos" utilizado en el presente documento se refiere a células óseas especializadas en producir la matriz particular del hueso, formada por cristales de hidroxiapatita, que se componen principalmente de fosfato y calcio. Los osteoblastos todavía mantienen la capacidad de replicarse, hasta que se rodean de matriz y pasan a un estado de mantenimiento de la matriz denominado osteocitos.

Las células madre mesenquimales diferenciadas pueden obtenerse mediante aislamiento de un tejido, cultivo de células (por ejemplo, cultivo de fibroblastos) y/o diferenciación de células madre mesenquimales.

Es una práctica habitual para un experto en la materia promover la diferenciación de células madre mesenquimales para obtener células madre mesenquimales condrogénicas tempranas, adipocitos, fibroblastos u osteoblastos.

En otra realización preferida, la matriz extracelular descelularizada (MECd) se desarrolla a partir de fibroblastos (MECdf), células madre mesenquimales (MECdm), células madre mesenquimales diferenciadas a adipocitos (MECda), células madre mesenquimales diferenciadas a fibroblastos (MECdfd), células madre mesenquimales diferenciadas a osteoblastos (MECdo) o células madre mesenquimales condrogénicas tempranas (MECdmc).

Además, para proporcionar un microambiente más favorable para la formación específica de tejidos, en la presente invención se usan matrices de células madre mesenquimales diferenciadas para obtener el hidrogel de la invención, es decir, matriz extracelular descelularizada condrogénica temprana derivada de CMM o MECdm condrogénica temprana. La concentración de las MECdmd en el hidrogel de la invención comprende un determinado rango.

En una realización preferida de la invención, la concentración de MECdmd en el hidrogel de la invención varía entre el 1 % p/v y el 10 % p/v sobre el porcentaje en peso total de

hidrogel. Las expresiones "% en peso" o "% p" o "% p/v" se consideran equivalentes y pueden usarse indistintamente en el presente documento y se refieren al porcentaje en peso con respecto al peso o volumen total de la solución o dispersión, a menos que se especifique otra cosa.

5

En otra realización más preferida del hidrogel de la invención, la MECdmd se selecciona entre el 2 % p/v, el 2,5 % p/v, el 3 % p/v, el 3,5 % p/v, el 4 % p/v, el 4,5 % p/v, el 5 % p/v, el 5,5 % p/v, el 6 % p/v, el 6,5 % p/v, el 7 % p/v, el 7,5 % p/v, el 8 % p/v, el 8,5 % p/v y el 9 % p/v, más preferentemente el porcentaje de MECdmd es del 3 o el 6 % p/v, más preferentemente el porcentaje de MECdmd es del 6 %.

10

Como sabe un experto en la materia, el hidrogel de la invención puede estar comprendido en una composición. Así pues, en otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición, en lo sucesivo en el presente documento, "composición de la invención", que comprende el hidrogel de la invención.

15

De acuerdo con las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, la composición de acuerdo con la presente invención puede formularse con un excipiente y/o vehículo. Por tanto, en una realización particular, la composición de la invención comprende un excipiente y/o vehículo. En caso de un uso terapéutico de la composición de la invención, ésta puede formularse con un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

20

El término "excipiente" se refiere a una sustancia que ayuda a absorber cualquiera de los componentes de la composición de la invención, estabiliza dichos componentes o ayuda en la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o, si es necesario, proporcionar aromas que la hagan más agradable. Por tanto, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos entre sí, tales como, por ejemplo, almidones, azúcares o celulosas, una función edulcorante, una función colorante, la función de protección del medicamento, tal como, por ejemplo, aislándolo del aire y/o la humedad, una función de carga para un comprimido, cápsula o cualquier otra forma de formulación, tal como, por ejemplo, fosfato de calcio dibásico, una función disgregante para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otros tipos de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término "excipiente" se define como cualquier material incluido en las formas galénicas que se añade a los principios activos o a sus asociaciones para permitir su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades fisicoquímicas de la composición y su biodisponibilidad. El excipiente "farmacéuticamente aceptable" debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, para que sea compatible con

30

35

dichos componentes. Son ejemplos de excipientes aglutinantes, cargas, disgregantes, lubricantes, recubrimientos, edulcorantes, aromatizantes y colorantes. Son ejemplos más específicos no limitantes de excipientes aceptables almidones, azúcares, xilitol, sorbitol, fosfato de calcio, grasas esteroideas, talco, sílice o glicerina, entre otros.

5

El término "vehículo" se refiere a un compuesto que facilita la incorporación de otros compuestos para permitir una mejor dosificación y administración o para proporcionar consistencia y forma a la composición. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se usa para diluir cualquiera de los componentes de la composición de la presente invención a un volumen o peso determinado, o incluso sin diluir dichos componentes, capaz de permitir una mejor dosificación y administración o proporcionar consistencia. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. En una realización particular, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

10

Adicionalmente, la composición de acuerdo con la presente invención puede formularse además con células madre embrionarias (CME), células madre no embrionarias o adultas, preferentemente células madre mesenquimales, células progenitoras, células MPi, células adultas maduras y/o células madre umbilicales, células estromales tumorales, células tumorales (de diferentes tipos moleculares y estadios de diferenciación) y muestras de tejido adiposo y tumorales. La expresión "células madre mesenquimales" se ha definido en párrafos anteriores del presente documento y es aplicable igualmente a este aspecto de la invención.

20

El hidrogel o la composición de la invención puede colocarse o incorporarse en un implante. Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere a un implante que comprende el hidrogel o la composición de la invención, en lo sucesivo en el presente documento, el implante de la invención

25

Las expresiones "implante" "dispositivo médico", "dispositivo", "implante médico" se usan como sinónimos y se refieren a cualquier objeto o elemento que sea biocompatible con el estado fisiológico del cuerpo del paciente y no produzca efectos secundarios adversos y que esté estructurado, diseñado o configurado para su colocación parcial o totalmente dentro del cuerpo de un paciente con uno o más fines terapéuticos o profilácticos, tales como el aumento de tejido, el contorneado, la restauración de la función fisiológica, la reparación o la restauración de tejidos dañados por enfermedad o traumatismo y/o la entrega de agentes terapéuticos a órganos y tejidos normales, dañados o enfermos. Aunque los dispositivos médicos normalmente se componen de materiales sintéticos biológicamente compatibles (por ejemplo, acero inoxidable de calidad médica, titanio y otros metales; polímeros

30

35

exógenos, tales como poliuretano, silicio, PLA, PLGA), también pueden usarse otros materiales en la construcción del implante médico. Los dispositivos e implantes médicos específicos que son particularmente útiles para la práctica de la presente invención incluyen implantes de tejidos blandos para cirugía estética y reconstructiva.

5

Los inventores obtuvieron el hidrogel de la invención mediante matriz extracelular descelularizada derivada de células madre mesenquimales diferenciadas (MECdmd), preferentemente células madre mesenquimales condrogénicas tempranas MECd, para obtener una MECdm condrogénica temprana. Los inventores obtuvieron el hidrogel de la invención mediante matriz extracelular descelularizada derivada de células madre mesenquimales cultivadas diferenciadas a adipocitos (MECda), fibroblastos (MECdfo) y osteoblastos (MECdo) o matriz extracelular descelularizada derivada de fibroblastos cultivados (MECdf).

10

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir el hidrogel biomimético de la invención, en lo sucesivo en el presente documento, el "método de la invención", que comprende:

- (a) cultivar células madre mesenquimales con al menos un compuesto que induce diferenciación o cultivar células madre mesenquimales diferenciadas, de un sujeto,
- (b) descelularizar el cultivo de la etapa (a), obteniendo una matriz extracelular descelularizada derivada de células madre mesenquimales diferenciadas (MECdmd),
- (c) liofilizar la matriz extracelular descelularizada obtenida en la etapa (b),
- (d) solubilizar la matriz extracelular descelularizada liofilizada obtenida en la etapa (c),
- y
- (e) gelificar la solución obtenida en la etapa (d) durante 15-30 min a 30 a 40 °C.

20

25

Las expresiones "células madre mesenquimales", "sujeto", "matriz extracelular descelularizada" y "células madre mesenquimales diferenciadas" se han definido en párrafos anteriores del presente documento y son aplicables igualmente a este aspecto de la invención.

30

Durante la etapa (a), las células madre mesenquimales (no diferenciadas) de un sujeto con al menos un compuesto induce diferenciación.

Como se ha descrito en aspectos inventivos anteriores, el hidrogel de la invención puede obtenerse mediante matriz extracelular descelularizada derivada de fibroblastos cultivados (MECdf), en donde las células no se cultivan con un compuesto que induce diferenciación. Es una práctica habitual para un experto en la materia aislar y cultivar las células madre

35

mesenquimales o células diferenciadas (particularmente, fibroblastos), preferentemente, las células se cultivan entre 25 °C y 45 °C, preferentemente de 30 a 40 °C, más preferentemente a 37 °C, en una atmósfera húmeda.

- 5 En otra realización más preferida, las células madre mesenquimales o las células madre mesenquimales diferenciadas se cultivan en monocapa o en un armazón 3D, preferentemente en monocapa.

10 Como se ha descrito anteriormente, en otra realización preferida, las células madre mesenquimales (o fibroblastos) son de mamífero, preferentemente de ser humano.

En otra realización más preferida, las células madre mesenquimales se aíslan de tejidos de médula ósea, placenta, sangre del cordón umbilical, tejido adiposo, músculo adulto, estroma corneal, líquido amniótico, endometrio y dientes, preferentemente de tejido adiposo.

15 Además, para permitir la formación de MEC, en otra realización preferida, las CMM se cultivan en monocapa con al menos un compuesto que induce diferenciación, preferentemente con al menos un compuesto que induce condrogénesis, adipogénesis, diferenciación de fibroblastos u osteogénesis durante al menos una semana, 20 preferentemente al menos dos semanas.

El término "condrogénesis" utilizado en el presente documento se refiere a la diferenciación de cualquier célula en un condrocito, particularmente, el proceso mediante el cual se forma cartílago a partir de tejido mesenquimal condensado, que se diferencia en condrocitos y 25 comienza a secretar las moléculas que forman la matriz extracelular.

El término "adipogénesis" utilizado en el presente documento se refiere a la formación de adipocitos (células grasas) a partir de células madre. Implica 2 fases, determinación y diferenciación terminal. La determinación es que las células madre mesenquimales se 30 comprometen a las células precursoras de adipocitos, también conocidas como preadipocitos que pierden el potencial para diferenciarse a otros tipos de células tales como condrocitos, miocitos y osteoblastos. La diferenciación terminal es que los preadipocitos se diferencian en adipocitos maduros. Los adipocitos pueden surgir de preadipocitos residentes en tejido adiposo o de células progenitoras derivadas de médula ósea que migran a tejido 35 adiposo.

La expresión "diferenciación de fibroblastos" utilizada en el presente documento se refiere a la adquisición de características y funcionalidades de fibroblastos por las células madre

mesenquimales.

El término "osteogénesis" utilizado en el presente documento se refiere a la formación de hueso. Existen dos modos principales de formación de hueso, u osteogénesis, y ambos implican la transformación de un tejido mesenquimal preexistente en tejido óseo. La conversión directa de tejido mesenquimal en hueso se denomina osificación intramembranosa. Este proceso se produce principalmente en los huesos del cráneo. En otros casos, las células mesenquimales se diferencian en cartílago, y este cartílago se reemplaza posteriormente por hueso. El proceso mediante el cual se forma un intermedio de cartílago y se reemplaza por células óseas se denomina osificación endocondral.

Es ampliamente conocido por un experto en la materia que la condrogénesis, la adipogénesis, la diferenciación de fibroblastos o la osteogénesis se promueven en presencia de compuestos o complementos. Los ejemplos de compuestos o complementos que inducen la condrogénesis, la adipogénesis, la diferenciación de fibroblastos o la osteogénesis incluyen, sin limitación, dexametasona, 2-fosfato de ácido ascórbico, L-prolina, insulina-transferrina-selenio, proteína morfогénica ósea (BMP, particularmente, BMP-2, BMP-4, BMP-7), TGF- β (particularmente, TGF- β 1 o TGF- β 3), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, particularmente, FGF-2), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), β -glicerofosfato, isobutilmetilxantina o indometacina.

En otra realización preferida del método de la invención, el compuesto que induce condrogénesis es dexametasona y/o TGF-3 β . En otra realización más preferida del método de la invención, la concentración de dexametasona es de 100 nM y/o la concentración de TGF-3 β es de 10 μ g/ml.

Para obtener la matriz extracelular descelularizada derivada de células madre mesenquimales diferenciadas (MECdmd), particularmente, la matriz extracelular descelularizada (MECd) derivada de células madre mesenquimales condrogénicas tempranas (MECdmc), de células madre mesenquimales diferenciadas a adipocitos (MECda), fibroblastos (MECdfe) y osteoblastos (MECdo) o matriz extracelular descelularizada derivada de fibroblastos cultivados (MECdf), es necesario descelularizar el cultivo de la etapa (a).

El término "descelularizar" o "descelularización" utilizado en el presente documento, se refiere al proceso de retirar o eliminar las células endógenas (fracciones o componentes celulares) de la MEC conservando al mismo tiempo sus propiedades estructurales y de composición, tejido u órgano nativos, proporcionando de este modo microambientes

específicos de tejido u órgano para el crecimiento y la función celulares.

Los métodos de descelularización son una práctica habitual para un experto en la materia. Son ejemplos de dichos métodos, sin limitación, descelularización con solución detergente, ácidos (ácido peracético), alcohol o reactivo alcalino (hidróxido de amonio), para romper membranas celulares y nucleares, seguida de tratamiento enzimático a base de tripsina o nucleasas, para alterar el contenido citoplasmático y romper los restos de ADN y ARN. La esterilización y la descelularización pueden ser simultáneas. Por ejemplo, y sin limitación, la esterilización con ácido peracético, descrita anteriormente, también puede servir para descelularizar la MEC. La descelularización también puede conseguirse a través del uso de otros métodos tales como ultrasonidos, calentamiento, aplicación de presión y electroporación.

En otra realización preferida del método de la invención, el tratamiento de descelularización de la etapa (b) se realiza con una solución detergente a 30-40 °C, preferentemente 35-39 °C, más preferentemente a 37 °C, durante 5-20 min o a 2 a 8 °C durante la noche, preferentemente a 4 °C durante la noche, preferentemente seguida de tratamiento con nucleasas a 30-40 °C, preferentemente 35-39 °C, más preferentemente a 37 °C durante 1-2 horas.

Son ejemplos de detergentes que pueden usarse en la etapa (b) del método de la invención, sin limitación, solución de Triton X-100, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), desoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio (SDS).

En otra realización preferida del método de la invención, la solución detergente comprende Triton X-100 y/o NH₄OH. En una realización más preferida, la concentración de Triton X-100 es de entre el 0,1 y el 0,5 %, preferentemente el 0,25 %, y la concentración de NH₄OH es de entre 10 y 50 mM, preferentemente 10 mM. En otra realización preferida del método de la invención, la nucleasa es desoxirribonucleasa, tal como ADNasa, y/o ribonucleasa, tal como RNasa. En otra realización preferida, la concentración de nucleasa es de 50 U/mL.

La liofilización de la MECdmd obtenida en la etapa (b) se realiza con el fin de obtener una preparación estable de la MECdmd. El término "liofilizar" o "liofilización", como se usa en el presente documento, se refiere a la congelación rápida y deshidratación del producto congelado en alto vacío y también se denomina habitualmente "secado por congelación".

Como alternativa, una vez que se completa la liofilización, la MECdmd obtenida en la etapa (c) del método de la invención se pulveriza en un polvo mediante trituración. En una

realización preferida de la invención, el método de la invención comprende adicionalmente una etapa adicional (c') triturar en polvo la matriz extracelular descelularizada liofilizada obtenida en la etapa (c). En otra realización más preferida del método de la invención, el tratamiento de trituración de la etapa (c') del método de la invención se realiza mediante

5 nitrógeno líquido.

Con el fin de hacer que la matriz extracelular descelularizada liofilizada obtenida en la etapa (c) o el polvo obtenido en la etapa (c') del método de la invención sean más hidrosolubles, se realiza una etapa de solubilización.

10

En otra realización preferida del método de la invención, la solubilización de la etapa (d) se realiza mediante digestión enzimática o tratamiento químico. En una realización preferida adicional, el tratamiento enzimático se realiza con pepsina, se realiza preferentemente con pepsina disuelta en HCl. En otra realización más preferida, la solubilización de la etapa (d)

15 se realiza a una concentración del 1 al 10 % p/v con pepsina entre 1 y 2 mg/mL disuelta en HCl de 0,01 a 0,1 M.

En otra realización preferida, la solubilización de la etapa (d) se realiza mediante tratamiento químico, preferentemente solubilización a base de urea, un procedimiento menos agresivo

20 que la digestión con pepsina y que permite una conservación mejor de los componentes de la MEC. En otra realización más preferida, el tratamiento químico se realiza con ácido acético y urea, preferentemente con ácido acético al 5 % y urea 3 M.

Una vez solubilizado el polvo de MECdmd, se realiza una etapa de gelificación. En una

25 realización preferida del método de la invención, la etapa (e) se realiza mediante neutralización con NaOH 1 M e incubación a 30 a 40 °C, preferentemente 35 a 29 °C, más preferentemente a 37 °C, durante 15-30 minutos.

En otra realización preferida del método de la invención, la concentración final de MECdmd

30 varía entre el 1 y el 10 % p/v.

En otra realización más preferida del método de la invención, la MECdmd se selecciona entre el 2 % p/v, el 2,5 % p/v, el 3 % p/v, el 3,5 % p/v, el 4 % p/v, el 4,5 % p/v, el 5 % p/v, el 5,5 % p/v, el 6 % p/v, el 6,5 % p/v, el 7 % p/v, el 7,5 % p/v, el 8 % p/v, el 8,5 % p/v y el 9 %

35 p/v, más preferentemente el porcentaje de MECdmd es del 3 o el 6 % p/v, preferentemente el 6 %.

El hidrogel de la invención tiene varios usos y aplicaciones. En consecuencia, un aspecto

adicional de la presente invención es el hidrogel o la composición o el implante de la invención para su uso como medicamento, de aquí en adelante, el uso medicinal de la invención.

- 5 Otro aspecto de la presente invención, es el hidrogel de la invención o composición o implante de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades degenerativas y/o traumáticas, de aquí en adelante, el uso de tratamiento de la invención.

10 Como se usa en el presente documento, el término "tratar" (o "trata" o "tratamiento" o "terapia") se refiere a procesos que implican ralentizar, interrumpir, detener, controlar, parar, reducir o revertir la progresión o gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad existente, pero no implica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas, afecciones o trastornos relacionados con la enfermedad. Además, el "tratamiento" también se refiere a un proceso que implica evitar la aparición de síntomas que aún no se han
15 manifestado, pero que se manifestarán debido a una progresión sin tratar del trastorno, afección o enfermedad. El tratamiento de un trastorno o enfermedad puede conducir, por ejemplo, a una detención de la progresión del trastorno o la enfermedad (por ejemplo, sin deterioro de síntomas) o a un retraso en la progresión del trastorno o enfermedad (en caso de que la detención de la progresión sea solo de naturaleza transitoria). El "tratamiento" de un trastorno o enfermedad también puede conducir a una respuesta parcial (por ejemplo, la mejoría de los síntomas) o una respuesta completa (por ejemplo, la desaparición de los síntomas) del sujeto/paciente que padece el trastorno o enfermedad. En consecuencia, el "tratamiento" de un trastorno o enfermedad también puede referirse a una mejoría del trastorno o enfermedad, que puede conducir, por ejemplo, a una detención de la progresión
20 del trastorno o enfermedad o a un retraso en la progresión del trastorno o enfermedad. Una respuesta parcial o completa de este tipo puede ir seguida de una recaída. Ha de comprenderse que un sujeto/paciente puede experimentar una amplia gama de respuestas a un tratamiento (tales como las respuestas de ejemplo descritas anteriormente en el presente documento). En la presente invención, la afección o el trastorno que ha de tratarse son enfermedades degenerativas.
25
30

La expresión "enfermedades degenerativas", como se usa en el presente documento, se refiere a una afección patológica en la que un tejido pierde su función original debido a la pérdida cuantitativa irreversible del tejido. Los ejemplos de la enfermedad degenerativa
35 incluyen, pero sin limitación, enfermedad neurológica cerebral, enfermedad isquémica, daño cutáneo, enfermedad ósea y artritis degenerativa.

La expresión "enfermedades traumáticas", como se usa en el presente documento, se

refiere a una afección patológica resultante del efecto de un agente externo o interno. Los ejemplos de la enfermedad traumática, pero sin limitación, incluyen quemaduras cutáneas, erupciones, fracturas cutáneas u óseas, es decir, cualquier lesión que conduzca a una pérdida de funcionalidad tisular.

5

En una realización preferida del tratamiento de la invención, la enfermedad degenerativa se selecciona entre la lista que consiste en: osteoartritis, artritis inflamatoria y artritis inducida por cristales. En una realización preferida del tratamiento de la invención, la enfermedad traumática se selecciona entre la lista que consiste en: lesiones óseas y cutáneas (tales como heridas, fracturas, roturas), lesiones de tejidos blandos y cirugías estéticas

10

Otro aspecto de la presente invención, es el uso del hidrogel de la invención o composición en el desarrollo farmacológico y el cribado preclínico de fármacos quimioterápicos, el estudio básico de la biología fundamental del cáncer y los procesos que median la proliferación, el crecimiento, la metástasis y la invasión tumorales.

15

El hidrogel o la composición de la invención pueden usarse como modelo de enfermedad *in vitro* de patologías, lesiones o tumores cutáneos.

20

El hidrogel de la presente invención o la composición de la invención pueden estar comprendidos en el implante de la invención, para formar un armazón de regeneración de tejidos que pueda implantarse en un sujeto.

25

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del implante de la invención para la regeneración de tejidos u órganos, de aquí en adelante, el uso regenerativo de la invención.

30

Los términos "tejido" o "tejido biológico" son intercambiables y se refieren a una colección de células interconectadas y matriz extracelular que realizan una función o funciones similares dentro de un organismo. Los tejidos biológicos incluyen, sin limitación, tejido conectivo, tejido muscular, tejido nervioso (del cerebro, la médula espinal y los nervios), tejido epitelial y tejido orgánico. El tejido conectivo incluye tejido fibroso, por ejemplo, fascia, tendón, ligamentos, válvulas cardíacas, hueso y cartílago. El tejido muscular incluye tejido muscular esquelético, tejido muscular liso, por ejemplo, tejido esofágico, estomacal, intestinal, bronquial, uterino, uretral, vesical y vascular sanguíneo, y tejido muscular cardíaco. El tejido epitelial incluye tejido epitelial simple, por ejemplo, tejido epitelial alveolar, tejido endotelial vascular sanguíneo, y tejido mesotelial cardíaco, y tejido epitelial estratificado. El tejido biológico puede seleccionarse adicionalmente, sin limitación, entre el grupo que consiste en válvula cardíaca, vaso, conducto vascular, arteria, vena, piel, dermis, pericardio, dura,

35

submucosa intestinal, ligamento, tendón, hueso, cartílago, uréter, vejiga urinaria, hígado, pulmón, cordón umbilical y corazón. Los órganos comprenden múltiples tejidos/tipos de tejidos. Los órganos se incluyen en el presente documento con los términos "tejido" y/o "tejido biológico". La fase "tejido intacto" se refiere al tejido que no se ha picado ni
 5 homogeneizado. El tejido intacto puede ser un tejido entero o un órgano completo. En una realización preferida del uso regenerativo de la invención, el tejido se selecciona entre una lista que consiste en: piel, hueso, tejido cardíaco, tejido cartilaginoso y tejido vascular.

El implante de la invención puede usarse para tratar enfermedades o afecciones que
 10 pueden beneficiarse de una mejora de la angiogénesis, la proliferación celular y/o la regeneración y/o el fortalecimiento tisulares. Dichas enfermedades o afecciones incluyen, pero sin limitación, quemaduras, úlcera, traumatismo, herida, fractura ósea, diabetes, psoriasis, artritis, asma, cistitis, inflamación, infección, isquemia, reestenosis, estenosis, aterosclerosis, oclusión, ictus, infarto, aneurisma, aneurisma aórtico abdominal, fibroide
 15 uterino, incontinencia urinaria, trastornos vasculares, hemofilia, cáncer e insuficiencia de órganos (por ejemplo, corazón, riñón, pulmón, hígado, intestino, etc.). La administración del hidrogel de la invención o de la composición de la invención o del implante compuesto por o que consiste en el hidrogel de la invención o la composición de la invención puede realizarse por inyección directa en el tumor, o por pulverización, cepillado u otra aplicación en el sitio
 20 de aplicación. En algunas realizaciones, se utiliza un vehículo de entrega, tal como colágeno. También pueden usarse soportes biocompatibles, tales como malla, en donde el soporte se recubre con el hidrogel. La fracción soluble del hidrogel de MEC solubilizado, o el hidrogel de MEC solubilizado puede administrarse por cualquier vía, incluyendo la administración parenteral, por ejemplo, inyección o infusión intravenosa, intraperitoneal,
 25 intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, intraarticular, administración sublingual, oral, tópica, intranasal o transmucosa, o por inhalación pulmonar. El médico puede seleccionar la vía de administración adecuada basándose en los requisitos de la presentación clínica.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso cosmético del hidrogel de la
 30 invención o la composición de la invención.

La expresión "uso cosmético" se refiere a un uso no terapéutico que puede mejorar el aspecto estético o la comodidad de la piel, el pelo y/o el cabello de mamífero, preferentemente de ser humano. En el presente contexto, el uso cosmético puede incluir
 35 evitar el daño y/o mejorar la piel, el pelo y/o y el cabello de ser humano.

El hidrogel o la composición de la invención puede adoptar la forma de una composición tópica que puede encontrarse en forma de una solución acuosa, acuosa-alcohólica u oleosa,

solución de tipo dispersión o dispersiones de tipo loción o suero, de emulsiones que tienen consistencia líquida o semilíquida del tipo de la leche, obtenidas por dispersión de una fase lipídica en una fase acuosa (O/W) o viceversa (W/O), o de una suspensión o emulsión que tiene una consistencia blanda, crema semisólida o sólida, gel acuoso o gel anhidro, o como alternativa microemulsión, microcápsula o micropartícula o de dispersión vesicular de tipo iónico y/o no iónico. Dichas composiciones se preparan mediante métodos habituales conocidos por el experto en la materia.

Los ejemplos de las composiciones para aplicaciones tópicas incluyen, sin limitación, cremas de limpieza y protectoras de tratamiento o cuidado de la cara, para las manos, para los pies, para los principales pliegues anatómicos o para el cuerpo (por ejemplo, cremas de día, cremas de noche, cremas desmaquillantes, cremas base, cremas solares), productos de maquillaje, tales como bases líquidas, leches limpiadoras, leches protectoras o de cuidado corporal, leches para después de la exposición al sol, lociones para el cuidado de la piel, geles o espumas, tales como lociones limpiadoras o desinfectantes, lociones solares, lociones bronceadoras artificiales, composiciones de baño, composiciones desodorantes que contienen un agente bactericida, geles o lociones para después del afeitado, cremas depilatorias o composiciones para picaduras de insectos, jabones, pastas, cremas, geles, emulsiones o espumas limpiadoras, composiciones de laca para el cabello, etc.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al estudio de la reducción de la efectividad de los fármacos, lo que puede beneficiar tanto en el conocimiento de nuevos fármacos como en la comprensión de los mecanismos de resistencia ejercidos por las células o también para el diseño de bioenlaces matriciales a partir de la impresión celular 3D. Además, usando biopsias de los propios pacientes, será posible obtener un modelo personalizado que permita un Barrido de Alto Rendimiento (*High Throughput Screening* o HTS, por sus siglas en inglés) previo para establecer el régimen terapéutico más adecuado en cada paciente y para el estudio de procesos moleculares básicos de varias enfermedades

Otro aspecto de la presente invención es el uso del hidrogel o la composición de la invención como biotinta para la bioimpresión 3D, de aquí en adelante, el uso de bioimpresión de la invención.

Otro aspecto de la presente invención es el uso del hidrogel o la composición de la invención como biotinta para la pulverización de células, de aquí en adelante, el uso de pulverización de la invención.

Otro aspecto de la presente invención es el uso del hidrogel o la composición de la

invención como biotinta para órganos y tejidos-en-un-chip o múltiples órganos-en-un-chip, de aquí en adelante, el uso de órgano-en-un-chip de la invención.

- El término "biotinta", como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrogel o una
- 5 mezcla de células con un hidrogel utilizado para bioimpresión. Por tanto, puede aplicarse una composición de biotinta para bioimpresión y pulverización. La expresión "bioimpresión 3D" utilizada en el presente documento se refiere a la utilización de técnicas similares a la impresión 3D para combinar células, factores de crecimiento y biomateriales para fabricar un
- 10 objeto, parte, tejido o estructura 3D que imitan al máximo las características naturales y biológicas. Preferentemente, la bioimpresión 3D utiliza el método de capa-por-capa para depositar materiales o biotintas para crear estructuras que después se usan en los campos de la biotecnología, la medicina y la ingeniería de tejidos. La expresión "pulverización de células" utilizada en el presente documento se refiere a la técnica de pulverización de células en placas de cultivo celular con una boquilla de aerosol de accionamiento de bomba.
- 15 La expresión "órgano-en-un-chip" utilizada en el presente documento se refiere a un sistema de cultivo celular que simula el microambiente y los aspectos funcionales clave de órganos vivos a escala microscópica, usando principios de tecnologías de biomimetismo, microingeniería y microfluídica.
- 20 Como es sabido por el experto en la materia, la composición de la biotinta puede contener varios otros componentes que encuentran un uso en el cambio de las características de la biotinta que son necesarias en el proceso de bioimpresión o en el producto final. Por tanto, en una realización preferente del uso de composición de la invención, la composición de la invención comprende adicionalmente al menos uno de los componentes seleccionados entre
- 25 una lista que consiste en: alginato, gelatina de varios orígenes (de pescado, bovina, de piel porcina), fibrinógeno de varios orígenes (bovino, porcino, de plasma humano), hialuronato de sodio intraarticular, fibroína de seda y sericina, xantano, genipina, agarosa, agar, quitosano, nanocelulosa, o sus variantes de metacrilóilo, o cualquier combinación de los mismos.
- 30 En otra realización preferida de la composición de la invención, la concentración de alginato y/o metacrilóilo de alginato es de entre el 1 y el 15 % p/v, preferentemente el 2,0 %, el 2,5 %, el 3,0 %, el 4,0 %, el 5,0 %, el 6,0 %, el 7,0 %, el 8,0 %, el 9,0 %, el 10,0 %, el 11,0 %, el 12,0 %, el 13,0 % o el 14,0 % p/v. En otra realización preferida, la concentración
- 35 de gelatina de piel porcina y/o concentraciones de metacrilóilo de gelatina son de entre el 5 y el 15 % p/v, preferentemente el 6,0 %, el 7,0 %, el 8,0 %, el 9,0 %, el 10,0 %, el 11,0 %, el 12,0 %, el 13,0 % o el 14,0 % p/v, más preferentemente del 10 %. En otra realización preferida de la composición de la invención, la concentración del fibrinógeno de plasma

bovino y/o hialuronato de sodio intraarticular es de entre el 0,5 y el 1,5 %, preferentemente del 0,6, el 0,7, el 0,8, el 0,9, el 1,0, el 1,1, el 1,2, el 1,3 o el 1,4 %.

En otra realización preferida de la composición de la invención, la fibroína de seda y sericina, xantano, genipina, agarosa, agar, quitosano, nanocelulosa, o la concentración de sus variantes de metacrilato es de entre el 0,2 % y el 10 % p/v.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. En la puesta en práctica de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos adicionales, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras examinar la descripción o pueden aprenderse mediante la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Caracterización fenotípica y potencial de diferenciación de las CMM. (A) La caracterización por FACS de las CMM mostró una expresión positiva de los marcadores de superficie CD105, CD90, CD73 y una expresión negativa o baja para CD45, CD133 y CD34. (B) El potencial de diferenciación de las CMM obtenidas a partir de lipoaspirado hacia el linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico se confirmó mediante rojo de alizarina S, rojo de aceite O y tinción con azul de toluidina, respectivamente. Barra de escala: 100 μ m.

Figura 2. Producción y caracterización de MECm condrogénicas tempranas. Análisis cuantitativo de componentes específicos de cartílago GAG (A) y colágeno de tipo II (B) en matriz derivada de CMM, cultivados en condiciones de cultivo condrogénico durante 1, 2, 3 y 4 semanas, normalizado a ADN de células en cultivo. Análisis cualitativo de componentes principales, colágeno y GAG en matriz derivada de CMM y condrocitos después de 2 semanas en cultivo mediante tinción histológica (rojo sirio, toluidina O) e inmunofluorescencia (colágeno de tipo II y agrecano) (C). Análisis cuantitativo de contenido de colágeno, colágeno II (D) y GAG (E) en matriz derivada de CMM y condrocitos después de 2 semanas en cultivo. Barra de escala: 50 μ m. Los datos representan la media $\pm$ D.T. (n = 3). **, p < 0,01; ***, p < 0,001, Ensayo T de Student.

Figura 3. Análisis de diferenciación de CMM hacia adipocitos y FB mediante la inducción con medio de cultivo específico y la tinción posterior con rojo sirio, azul de toluidina, azul alciano, tinción con rojo de aceite O y vimentina, respectivamente.

5 **Figura 4.** Caracterización histológica de MECd de FB antes y después del proceso de descelularización, en comparación con el tejido dérmico nativo y el tejido dérmico nativo descelularizado. Las tinciones de hematoxilina-eosina, rojo sirio (colágenos), azul de toluidina (GAG), azul alciano (PG) y Dapi (ADN) mostraron una descelularización correcta y una similitud con el tejido referente.

10 **Figura 5.** Caracterización histológica de MECd de CMM antes y después del proceso de descelularización. Las tinciones de hematoxilina-eosina, rojo sirio (colágenos), azul de toluidina (GAG), azul alciano (PG) y Dapi (ADN) mostraron una descelularización correcta y una matriz rica en componentes tisulares nativos.

15 **Figura 6.** Descelularización de matriz condrogénica temprana derivada de CMM. (A) Análisis cualitativo por imagen de microscopio óptico (luz de contraste de fase) y tinción histológica: HyE (contenido celular), tricrómico de Masson (colágeno) y toluidina O (GAG). Análisis cuantitativo de contenido de ADN (B), colágeno (C) y GAG (D). Barra de escala: 20 50 μm (contraste de fases) y 200 μm (tinción histológica). Los datos representan la media $\pm$ D.T. (n = 3). ***, $p < 0,001$, Ensayo T de Student.

Figura 7. Formulación y caracterización de hidrogel de MECdm. (A) Preparación de elucidación esquemática de hidrogel basado en MECdm condrogénica temprana. (B) 25 Micrografías electrónicas de barrido (MEB) de hidrogel de MECdm reticulado. Aumentos de 10.000 $\times$ (a la izquierda) y 40.000 $\times$ (a la derecha). (C) Comportamiento de flujo de cizalla estacionaria del hidrogel con una rampa isotérmica de velocidad de cizalla ascendente y descendente a 15 °C. (D) Comportamiento de recuperación de cizalla transitoria del hidrogel con cambios isotérmicos escalonados en la velocidad de cizalla a 15 °C. Gelificación 30 inducida térmicamente del hidrogel, determinada mediante ensayos de viscoelasticidad lineal (E) y mediante el factor de pérdida (G''/G') (F) de los hidrogeles de 20 °C a 40 °C. Los datos representan la media $\pm$ D.T. (n = 3).

Figura 8. Evaluaciones biológicas *in vitro* de hidrogel de MECdm. (A) Imágenes confocales 35 representativas de viabilidad celular usando el ensayo Viva/Muerta a los 1, 10 y 28 días (verde para las células vivas, rojo para las células muertas). (B) Viabilidad celular (%) en el hidrogel de MECdm después de 1, 10 y 28 días. (C) Velocidad de proliferación de CMM cultivadas en hidrogel de MECdm en comparación con el día 0 de cultivo. (D) Análisis de la

expresión génica de genes condrogénicos específicos (COL2A1, ACAN, SOX9) y no específicos (COL1A1) de CMM incrustadas en MECdm al 3 y al 6 % a lo largo del tiempo en cultivo (2,4 semanas) y condrocitos en cultivo durante 2 semanas (control +). (E) Análisis de inmunotinción para colágeno de tipo II y colágeno de tipo I. Barra de escala 100 μ m. Los datos se expresan como media $\pm$ D.T. (n = 3); *, # p < 0,01, Ensayo T de Student. (*) Valor significativamente diferente en comparación con valores de CMM cultivadas el día 0; (#) Valor significativamente diferente en comparación con valores de CMM en hidrogeles de MECdm al 3 y al 6 % después de 4 semanas en cultivo (p < 0,01).

Figura 9. Evaluaciones biológicas *in vivo* de hidrogel de MECdm. (A) Imágenes a las 4 semanas de postimplantación en ratones CD1. (B) Tinción DAPI que muestra células que infiltran los geles de MECdm acelulares al 3 % y al 6 % los días 0, 14 y 28 después de su implantación subcutánea en ratones CD1. (C) Análisis histológico de geles de MECdm a concentraciones del 3 % y el 6 %, microgránulos de CMM prediferenciadas *in vitro* con medio condrogénico después de su implantación subcutánea en ratones NSG a las 2 y 4 semanas, y cartílago articular (control +). Las flechas indican células incrustadas en lagunas. Barra de escala 100 μ m.

Figura 10. Caracterización histológica de MECd de tejido adiposo después de tres procesos de descelularización diferentes (protocolo 1, 2 y 3). Las tinciones de hematoxilina-eosina, rojo sirio (colágenos), azul de toluidina (GAG) y azul alciano (PG) mostraron una descelularización correcta y una matriz rica en componentes tisulares nativos.

Figura 11. Tabla con las biotintas desarrolladas que contenían MECd derivada de tejido al 3 %, gelatina de piel de bovino o metacrilato de gelatina al 10 %, alginato al 2,5 % y fibrinógeno al 1 % o hialuronato de sodio de APM intraarticular al 2,5 %.

EJEMPLOS

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Aislamiento, cultivo y caracterización de estirpes celulares

Las células madre mesenquimales humanas (CMMh) y los fibroblastos humanos (hFB) se aislaron de tejido adiposo de pacientes que se sometieron a un procedimiento de liposucción y de tejido cutáneo durante cirugía de abdominoplastia mediante digestión enzimática usando colagenasa I (Sigma Aldrich), respectivamente, después del consentimiento informado y la autorización del Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Málaga,

España.

La caracterización del aislamiento de las CMMh se ha publicado anteriormente en *López Ruiz E., et al, 2013, Osteoarthr. Cartil., 21, 246*. Las células se sembraron en medio de crecimiento [medio Eagle modificado de Dulbecco con alta glucosa (DMEM; Sigma-Aldrich) complementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS; Sigma-Aldrich), penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 mg/ml (Invitrogen Inc.)] a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. El medio se cambió cada 3 días y cuando las células alcanzaron el 80 % de confluencia, se subcultivaron. Para todos los experimentos, las CMMh se usaron entre los

El tejido dérmico se procesó mecánicamente y se digirió con colagenasa I 2 mg/ml (Sigma Aldrich) a 37 °C durante la noche. Después, se filtró con un CellStrainer (Falcon) de 100 µm y la colagenasa se inactivó con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich) con suero fetal bovino al 10 % (FBS; Sigma-Aldrich). Las células se sembraron en medio de crecimiento [medio Eagle modificado de Dulbecco con alta glucosa (DMEM; Sigma-Aldrich) complementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS; Sigma-Aldrich), penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 mg/ml (Invitrogen Inc.)] a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. El medio se cambió cada 3 días y cuando las células alcanzaron el 80 % de confluencia, se subcultivaron.

Se caracterizó el fenotipo y el potencial de diferenciación de las células aisladas, como se ha descrito anteriormente en *Dominici M., et al, 2006, Cytotherapy, 8, 315*. Para examinar su inmunofenotipo, las células se tripsinizaron, se lavaron y se resuspendieron en PBS con albúmina sérica bovina al 1 % (BSA; Sigma-Aldrich). Se incubó un total de 2×10^5 células en la oscuridad durante 30 min con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo [CD34, CD45, CD90, CD73, CD105 y CD133 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EE. UU.)], se lavaron en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences).

Para los ensayos de diferenciación, las células madre mesenquimales (CMM) se cultivaron en placa a 1×10^5 células/cm² en DMEM-FBS en placas de cultivo de 6 pocillos. Después de 48 h, el medio de cultivo se reemplazó con medio específico inductor de diferenciación. Para la diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica, se cultivaron células durante 2 semanas en el kit hMSC Adipogenic Differentiation BulletKit™ (Lonza), el kit hMSC Osteogenic Differentiation BulletKit™ (Lonza) y el medio StemMACS ChondroDiff Medium (Miltenyi Biotec), respectivamente. Los cultivos de células diferenciadas se tiñeron con rojo de aceite O (Amresco, Solon, OH, EE. UU.) para la diferenciación adipogénica, rojo de

alizarina (Lonza) para la diferenciación osteogénica o azul de toluidina (Sigma-Aldrich) para la diferenciación condrogénica.

1.2. Aislamiento y cultivo de condrocitos

Se aislaron condrocitos de cartílago articular de pacientes con osteoartritis durante la cirugía de reemplazo articular después del consentimiento informado de todos los pacientes y la aprobación del Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Málaga, España. La muestra se aisló del lado femoral, seleccionando el compartimento de no sobrecarga: cóndilo lateral en rodillas en varo y cóndilo medial en los casos en valgo.

Ninguno de los pacientes tenía antecedentes de artritis inflamatoria o artritis inducida por cristales, y solo se usó para este estudio cartílago que macroscópicamente parecía relativamente normal. Se sembraron células en medio de condrocitos [medio de crecimiento complementado con ITS al 1 % (Insulina-Transferrina-Selenio, Gibco), 50 µg/µl de ácido ascórbico (Sigma), 40 µg/µl de prolina (Sigma) y penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml], a 37 °C en una atmósfera humidificada con un CO₂ al 5 %. Al 80 % de confluencia las células se subcultivaron.

1.3. Protocolos de diferenciación celular

Tras alcanzar el 100 % de confluencia celular, las CMM se indujeron a diferenciarse en FB, condrocitos, osteoblastos y adipocitos. Para este fin, se cultivaron durante dos semanas con sus respectivos medios de diferenciación (Tabla 1).

Factores de diferenciación			
CMM → Condrocitos	ITS (Thermofisher) al 1 %	Dexametasona (Sigma) 0,1 µM	TGF-β (Invitrogen) 10 ng/ml
CMM → Osteoblastos	Dexametasona (Sigma) 0,1 µM	β-Glicerofosfato (Sigma) 15 mM	Ácido ascórbico (Sigma) 50 µg/ml
CMM → FB	Ácido ascórbico (Sigma) 50 µg/ml	Factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) (Sigma) 40 ng/ml	
CMM → Adipocitos (A)	IBMX (Sigma) 0,5 mM	Dexametasona (Sigma) 1 µM	ITS (Gibco) 1 mg/ml

Tabla 1. Complementos de medios de diferenciación.

1.4. Protocolo de generación de matriz

- 5 Cuando los cultivos de las secciones 1.1, 1.2 y 1.3 alcanzaron el 100 % de confluencia, se inició el tratamiento con un medio de enriquecimiento de matriz durante tres semanas sin subcultivar las células. Se cultivaron estirpes celulares con DMEM (Sigma-Aldrich) con FBS al 10 % (Sigma-Aldrich), penicilina/estreptomicina al 1 % (Sigma-Aldrich), ácido ascórbico 50 g/ml (Sigma Aldrich) y l-prolina 40 g/ml (Sigma Aldrich).

10

1.5. Producción de la MECm condrogénica temprana

- En confluencia completa, las CMM se liberaron con TryPLE (Invitrogen) y se subcultivaron en placas de Petri a una densidad celular de 1×10^5 células/cm². Para permitir la formación de membrana de MEC, se cultivaron en monocapa durante 1, 2, 3 o 4 semanas en medio de condrocitos complementado con dexametasona (100 nM) y TGF- β 3 (10 ng/ml) a 37 °C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. El medio se refrescó cada 2 o 3 días. Como control, se generó MEC a partir de condrocitos en cultivo de la misma manera, pero sin usar complementos.

20

1.6. Protocolo de descelularización de matriz

- Al final del período de cultivo, las células se separaron de la matriz subyacente mediante la exposición a un tratamiento de descelularización, seleccionado entre una diversidad de metodologías que se han publicado anteriormente para preparar armazones de matriz extracelular derivada de cartílago cultivado (MECd-c) (*Hoshiba T., et al, 2011, Biotechnol. Prog., 27, 788*).

- Brevemente, el procedimiento químico consistió en la incubación en una solución detergente que contenía Triton X-100 al 0,25 % e hidróxido de amonio (NH₄OH) 10 mM a 37 °C durante 5 min o a 4 °C durante la noche, seguida de tratamiento con desoxirribonucleasa I (DNasa) 50 unidades/ml y ribonucleasa (RNasa) A 50 mg/ml (Invitrogen) en Tris-HCl 10 mM (Sigma) durante 2 h a 37 °C. Después de varios lavados con PBS, las placas de cultivo se examinaron mediante microscopía óptica para garantizar que se había retirado todo el material celular. Por último, el sobrenadante se retiró y la matriz que quedaba en la placa se

35

raspó y se liofilizó.

1.7. Preparación de hidrogel basándose en un protocolo de solubilización basado en pepsina

5

Se trituraron MECd liofilizadas hasta convertirlas en polvo, usando N₂ líquido. La cantidad necesaria de polvo de MECd se digirió en solución de pepsina (1 mg/ml en HCl 0,1 M) durante 48 h. Se prepararon MECd a dos concentraciones: 3 y 6 % p/v. Después de solubilizar las MECd, el pH se neutralizó con la adición gota a gota de NaOH 1 M y PBS 10X (hasta la dilución final 1X), a temperaturas bajas (por debajo de 15 °C) para evitar la gelificación de las MECd. Los pregeles resultantes de MECd se mezclaron con CMM a una concentración de 5×10^6 células/ml para estudios biológicos adicionales. Después de la gelificación a 37 °C durante 15 minutos, los hidrogeles de MECd con células incrustadas se mantuvieron en medio de crecimiento durante un tiempo específico, definido en cada experimento.

15

1.8. Protocolo de solubilización basado en urea

Las MECd liofilizadas se solubilizaron en ácido acético al 5 % (Sigma), a 4 °C, y se agitaron de forma continua durante la noche. Después, se añadió un tampón de urea 3M (Sigma), agitando durante la noche a 4 °C. Después de 24 h, la solución se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se congeló a -20 °C. El sedimento se trató de nuevo durante 48 h adicionales en tampón de urea 3 M, se agitó de forma continua a 4 °C, y el tampón se refrescó a las 24 h. Después, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante se congeló a -20 °C. Los dos sobrenadantes se agruparon y se dializaron durante 72 horas a 4 °C. La solución se liofilizó por último para su almacenamiento. Las MECd liofilizadas se disolvieron a una concentración final del 1 al 10 % p/v en ácido acético al 5 % con agitación durante 10 min a temperatura ambiente. Para gelificar, la MECd se neutralizó con NaOH 1 M (Sigma) y se incubó a 37 °C durante 15 minutos.

25

1.9. Ensayos reológicos

Las propiedades reológicas de los hidrogeles de MECdm (al 3 % y al 6 % p/v) se investigaron con un reómetro de torsión (MCR301, Anton Paar, Austria) usando una geometría de placa cónica (diámetro de 20 mm y ángulo de 2°). Se realizaron ensayos de cizalla estacionaria para determinar la viscosidad de cizalla a 15 °C. Estos ensayos consistieron en cuatro etapas. En la primera, la muestra se cizalló previamente a una velocidad de cizalla constante (500s^{-1}) durante 30 segundos. En la segunda etapa, la

35

muestra se dejó reposar durante 30 segundos en ausencia de cizalla. En la tercera etapa, la velocidad de cizalla se aumentó logarítmicamente de $0,1 \text{ s}^{-1}$ a 1000 s^{-1} . Por último, en la cuarta etapa, la velocidad de cizalla se disminuyó de 1000 s^{-1} a $0,1 \text{ s}^{-1}$ para explorar si la muestra es tixotrópica o no.

5

Para conocer mejor el comportamiento tixotrópico de las muestras, también se realizaron ensayos de flujo intermitente usando cambios escalonados en la velocidad de cizalla con una duración del punto de medición logarítmica de 0,01 a 10 s a $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$. El protocolo consistió en seis etapas. En la primera etapa, la muestra se cizalló previamente a una

10 velocidad de cizalla constante (500 s^{-1}) durante 30 s. En la segunda etapa, la muestra se dejó reposar durante 30 s en ausencia de cizalla. La tercera etapa consistió en un ensayo de arranque a 1000 s^{-1} mientras que la cuarta etapa consistió en reducir repentinamente la velocidad de cizalla a 0 s^{-1} . Las etapas tres y cuatro se repitieron en los intervalos cinco y seis por coherencia con el fin de medir los transitorios de viscosidad.

15

La gelificación impulsada por calor de las muestras se investigó usando ensayos de cizalla oscilatoria de amplitud pequeña (SAOS, por sus siglas en inglés) a una amplitud de deformación del 1 % y una frecuencia de 1 Hz. El protocolo consistió en dos etapas. En la primera etapa, las muestras se equilibraron a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. Por último, en la segunda

20 etapa se realizaron ensayos de SAOS mientras la temperatura aumentaba de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de $1 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

20

1.10. Viabilidad celular

Se usó el ensayo del kit Live/Dead kit (Thermo Fisher Scientific) para evaluar la viabilidad celular, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se observaron imágenes de las muestras usando un microscopio confocal (Nikon Eclipse Ti-E) y se analizaron con el software Image J (v. 1.52i, EE. UU.). El porcentaje de células viables se obtuvo contando seis regiones de cada muestra ($n = 3$).

30

1.11. Proliferación celular

La tasa de proliferación de las células incrustadas en hidrogeles de MECdm ($n = 3$) se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de azul de alamar (aB) (Thermo Fisher Scientific)

35 en diferentes puntos temporales, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se normalizó con respecto al control adecuado sin células. Los datos de absorbancia se representaron como un factor de multiplicación con respecto al día 0.

35

1.12. Análisis de expresión génica

Se aisló ARN mensajero (ARNm) total de CMM incrustadas en hidrogeles de MECdm ($n = 3$) en diferentes puntos temporales usando TriReagent (Sigma) y se transcribió inversamente en ADNc usando el kit Reverse Transcription System (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se realizó usando una mezcla SYBR green master mix (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión génica para el colágeno de tipo II (COL2A1), el agregano (ACAN), el factor 9 de transcripción de Sox (SOX-9) y el colágeno de tipo I (COL1A1) se normalizaron con respecto al gen constitutivo de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y se mostraron como un factor de multiplicación con respecto al valor de las CMM incrustadas el día 0.

1.13. Histología

Se fijaron hidrogeles de MECd, microgránulos, tejido cartilaginoso articular, tejido dérmico y tejido dérmico descelularizado, en paraformaldehído (PFA) al 4 %, se deshidrataron en serie, se incrustaron en parafina y se seccionaron (4 μ m de espesor) con un microtomo (Leica RM2255, Leica Biosystems, EE. UU.). Las muestras se rehidrataron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HyE), toluidina O, tricómico de Masson, azul alciano, rojo de alizarina/verde claro (RA/VC). Para la tinción en monocapa, las células fijadas se tiñeron directamente usando toluidina O y rojo sirio. Todas las muestras se fotografiaron usando el microscopio Leica DM 5500B en campo claro y se analizaron usando el software Image J.

1.14. Ensayos bioquímicos cuantitativos

La MECm y la MECdm liofilizadas se digirieron con papaína y se sometieron a ensayo para cuantificar los GAG y el ADN. El contenido de GAG se estimó mediante un ensayo colorimétrico con azul de dimetil metileno (DMMB). El contenido de ADN se cuantificó mediante un ensayo fluorométrico usando tinción con DAPI. Para la cuantificación del colágeno, las muestras liofilizadas se solubilizaron en primer lugar en una solución de pepsina (2 mg/ml en ácido acético 0,5 M). El contenido total de colágeno se midió mediante tinción con rojo picrosirio. El contenido de colágeno de tipo II se determinó usando un kit de ELISA disponible en el mercado Collagen type II ELISA kit (Chondrex).

El contenido de GAG se estimó a través de la cuantificación de la cantidad de GAG sulfatados un ensayo colorimétrico con azul de dimetil metileno (DMMB). Con ese objetivo, las muestras se digirieron en 1 ml de solución de papaína (125 mg/ml de papaína en fosfato

de sodio 0,1 M con Na₂-EDTA 5 mM y cisteína-HCl 5 mM a pH 6,5) durante 16 h a 60 °C. El extracto resultante se mezcló con solución de DMMB para unir los GAG. El contenido se calculó basándose en una curva patrón de sulfato de condroitina de cartílago de tiburón (Sigma) a 570 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

5

El contenido total de colágeno se midió mediante tinción con rojo picrosirio. Para esto, se solubilizó en primer lugar mediante la incubación de la matriz con pepsina en ácido acético 0,5 M (2 mg/ml) y se tiñó con 1 ml de colorante rojo sirio durante 30 min a temperatura ambiente. Después, la tinción se disolvió usando hidróxido de sodio 0,5 N (NaOH 0,5 N) y la absorbancia se midió a 560 nm usando un lector de microplacas (Berthold technologies, EE. UU.). Se usó colágeno de tipo I (cola de rata) como patrón para los ensayos bioquímicos.

10

El contenido de colágeno de tipo II se determinó usando un kit de ELISA disponible en el mercado Collagen type II ELISA kit (Chondrex). Para esto, las muestras se digirieron con pepsina (1 mg/ml) en ácido acético 0,5 N durante 48 h a 4 °C seguido de la adición de solución de elastasa pancreática 1 mg/ml a 4 °C durante 24 h. Por último, éstas se neutralizaron con base Tris 1 M. El material insoluble se retiró mediante centrifugación a 10.000 rpm a TA durante 5 min y el sobrenadante se recogió para el ensayo. El análisis cuantitativo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se midió en el espectrofotómetro de microplacas a 490 nm.

20

El contenido de ADN se cuantificó mediante un ensayo fluorométrico usando tinción con DAPI. Para esto, las muestras se digirieron en solución de papaína durante 16 h a 60 °C. El extracto resultante se tiñó con DAPI. La intensidad de fluorescencia se midió en un espectrofotómetro de fluorescencia (longitud de onda de excitación: 360 nm, longitud de onda de emisión: 450 nm). Se usó ADN de timo de ternera para crear una curva patrón para cuantificar el ADN en las muestras.

25

1.15. Ensayo de inmunotinción

30

Se fijaron monocapas celulares, hidrogeles de MECdm, microgránulos y tejido cartilaginoso articular con PFA al 4 % en PBS durante 20 min a TA. Para el análisis por inmunofluorescencia, se incrustaron hidrogeles de MECdm, microgránulos y tejido cartilaginoso articular en compuesto de temperatura de corte óptima (OCT, por sus siglas en inglés) y se seccionaron usando un criotomo con un espesor de 10 µm. Las secciones y monocapas se trataron con un anticuerpo primario contra el colágeno de tipo I (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), colágeno de tipo II (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) y agregano (Sigma, 1:100). Después, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios

35

conjugados con AlexaFluor 488 o 594 (ThermoFisher, 1:500) y se contratiñeron con DAPI. Se obtuvieron imágenes usando un microscopio Leica DM 5500B y se analizaron con el software Image J.

5 1.16. Análisis por espectrometría de masas (EM)

La caracterización completa del contenido de proteínas en MECm se realizó mediante espectroscopia de masas en tándem (CL/EM). Las muestras se resuspendieron en NH_4HCO_3 50 mM (pH 8,5) y se digirió una pequeña parte (1/20). Las mezclas de péptidos secadas se analizaron en un cromatógrafo de líquidos nanoAcquity (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Los datos se utilizaron para buscar en una versión modificada de la base de datos pública SwissProt human. La búsqueda en la base de datos se realizó con el motor de búsqueda Sequest HT usando Thermo Proteome Discover (v.1.4.1.14). Los resultados se observaron en Proteome Discoverer (v.1.4.1.14) y las listas de proteínas identificadas se exportaron como un archivo de Excel.

1.17. Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)

La microestructura interna del hidrogel se examinó usando MEB. Se fijó hidrogel de MECdm a diferentes concentraciones en glutaraldehído frío al 2,5 %. Después de varios lavados con PBS, las muestras se deshidrataron usando una serie graduada de etanol (30-100 %). Éstas se secaron en punto crítico en un secador de punto crítico Emscope CPD 750, se fijaron a pernos de montaje de aluminio para muestras de ensayo de MEB y se recubrieron mediante pulverizador iónico con una aleación de oro y paladio, usando un Sputter Coater 108 Auto. Se obtuvieron imágenes de las muestras usando un MEB (Quanta 400 (FEI), a un aumento de 10.000x y 40.000x.

1.18. Experimentos *in vivo*

Se realizaron ensayos *in vivo* de acuerdo con las directrices aprobadas de la Universidad de Granada y siguiendo las normas institucionales e internacionales para el bienestar animal y el procedimiento experimental. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Granada.

La biocompatibilidad *in vivo* se evaluó en ratones CD1 inmunocompetentes (ICR). Se introdujeron geles acelulares en armazones de PCL (una estructura porosa de tipo cilíndrico, 8 x 5 mm; tamaño de poro de 3 mm) para facilitar su localización, y se trasplantaron en el

tejido subcutáneo posterior de ratones anestesiados mediante inhalación de isoflurano (n = 6).

Para la evaluación *in vivo* de la formación de tejido y la maduración del cartílago, se
 5 inyectaron por vía subcutánea hidrogeles de MECdmc al 3 y al 6 % cargados con células
 (5x10⁶ células /ml), cultivadas previamente en medio de crecimiento durante 2 semanas *in vitro*, en ratones inmunodeficientes NOD SCID gamma (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, NSG) (n = 8) siguiendo la misma metodología que en el experimento con ratones CD1.
 Como control positivo (n = 6) los presentes inventores usaron CMM prediferenciadas hacia
 10 el linaje condrogénico en sistema de microgránulos durante 2 semanas *in vitro*. Para esto, se centrifugaron 3x10⁵ CMM (1500 rpm, 5 min) en un tubo cónico de 15 ml y se incubaron con las tapas sueltas a 37 °C y CO₂ al 5 %. El medio condrogénico se cambió cada dos días durante 2 semanas y los tubos se agitaron suavemente para evitar la adherencia del sedimento a las paredes de plástico. Los animales se mantuvieron en un sistema de jaulas
 15 microventiladas con comida y agua a demanda. Los ratones se manipularon en un flujo de aire laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Dos y cuatro semanas después, los ratones se sacrificaron a través de una inyección de sobredosis de anestésicos y se extirparon los hidrogeles para su posterior análisis histológico y de inmunofluorescencia.

20 1.19. Análisis estadístico

Todos los datos del gráfico representan la media +/- DT de al menos tres experimentos. Para determinar las diferencias entre las condiciones, se usó el ensayo T de Student de dos colas para el análisis de la bioquímica cuantitativa para determinar las diferencias entre las
 25 condiciones y el ensayo ANOVA de dos vías para el análisis de la expresión génica usando el software GraphPad Prism 8.3.0. Los supuestos de homocedasticidad y normalidad de los datos se sometieron a ensayo y se garantizaron mediante el uso de conjuntos de datos transformados [log(valor de la variable dependiente +1)] cuando fue necesario. Los valores de P < 0,001 (***), < 0,01 (**) y < 0,05 (*) se consideraron estadísticamente significativos en
 30 todos los casos.

1.20. Formulaciones de biotintas

Se realizaron diferentes formulaciones de biotintas para analizar sus propiedades. Las
 35 combinaciones estudiadas se muestran en la tabla a continuación (Tabla 2).

MECd al	Alginato	Gelatina de piel porcina	Fibrinógeno de plasma bovino
3 %	(Sigma) al 2,5 %	(Sigma) al 10 %	(Sigma) al 1 %
		Metacriloílo de gelatina (Sigma) al 10 %	Fibrinógeno de plasma bovino (Sigma) al 1 %
		Gelatina de piel porcina (Sigma) al 10 %	Hialuronato de sodio APM intraarticular (Bioibérica) al 1 %
		Metacriloílo de gelatina (Sigma) al 10 %	Hialuronato de sodio APM intraarticular (Bioibérica) al 1 %
		Gelatina de piel porcina (Sigma) al 10 %	Plasma humano rico en plaquetas al 1 %

Tabla 2. Diferentes formulaciones de biotintas

La adición novedosa de MECd en la formulación de biotinta proporciona la compleja composición del tejido nativo.

5

El alginato es un polisacárido aniónico que proporciona viscosidad a la formulación y también adquiere propiedades adhesivas y de sellado con una mínima reacción de cuerpo extraño sobre superficies húmedas. Se gelificó usando CaCl_2 100 mM - 1 M.

- 10 La gelatina de piel porcina es una mezcla de proteínas hidrosolubles y biocompatibles presentes en el colágeno y es un compuesto habitual en el recubrimiento de cultivos celulares para mejorar la adhesión celular y en la ingeniería de tejidos para la generación de armazones. Otra opción es el uso de metacrilato de gelatina, común en la formación de hidrogeles reticulados para la ingeniería de tejidos y la impresión 3D para la morfogénesis
- 15 de diferentes tipos celulares.

Además, el fibrinógeno es una proteína de coagulación cuya combinación con trombina al 0,9 % produce fibrina, una proteína insoluble capaz de formar redes tridimensionales, lo que lo convierte en un material adecuado como parte estructural de la biotinta final. Como

20 alternativa al fibrinógeno, se ha estudiado el uso de Hialuronato de Sodio de APM Intraarticular, un polisacárido producido principalmente por células mesenquimales que estimula la producción de colágeno, o Plasma Rico en Plaquetas (PRP), células implicadas en la coagulación ricas en factores de crecimiento que promueven la migración y la división celulares y estimulan la reparación en tejidos dañados.

Todos estos compuestos se habían diluido anteriormente en PBS 1X. Por último, para obtener la biotinta final, todos los compuestos se mezclaron homogéneamente con agitación a 37 °C.

5

2. RESULTADOS

2.1. Producción y caracterización de MECm

10 Se caracterizaron CMM aisladas de lipoaspirado de pacientes siguiendo los criterios establecidos de la Sociedad Internacional para Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés) para definir células estromales mesenquimales multipotentes (Figura 1).

15 En un intento de producir un hidrogel que recrease mejor el ambiente durante la condrogénesis, se sintetizó una matriz condrogénica temprana a partir de CMM. Para esto, se cultivaron CMM en monocapa y en medio condrogénico durante diferentes puntos temporales (1, 2, 3 y 4 semanas). Se realizó la cuantificación de los principales componentes del cartílago articular, tales como el colágeno de tipo II y los GAG sulfatados, para investigar las diferentes etapas de la condrogénesis. Después de 1 semana en cultivo,

20 el contenido de GAG por μg de ADN de las CMM cultivadas en el medio condrogénico estaba al mismo nivel que el cultivado en el medio de crecimiento (Figura 2A). No obstante, la relación GAG/ADN aumentó significativamente con el aumento del tiempo de cultivo celular. Se observó una situación similar para el colágeno II, cuyos niveles se apreciaron dos semanas después del cultivo de CMM en condiciones condrogénicas y aumentaron

25 notablemente a lo largo del tiempo, más específicamente durante la última semana (Figura 2B). A la vista de estos resultados, puesto que la formación de la matriz condrogénica comenzó después de dos semanas en cultivo y este tiempo fue suficiente para inducir la deposición inicial de componentes condrogénicos, que caracteriza las etapas tempranas de la condrogénesis, se usó esta vez para los ensayos posteriores.

30

Después, la producción de la matriz condrogénica temprana se confirmó comparando la MECm de dos semanas y la matriz condrogénica madura derivada de condrocitos (MECc) en cultivo durante dos semanas. La histología y la tinción de inmunofluorescencia revelaron la presencia y la distribución diferenciales de los principales componentes de la MEC. La

35 Figura 2C muestra que ambas MEC expresaban niveles similares de colágeno y GAG, aunque en la MEC derivada de condrocitos había una expresión significativamente mayor de componentes específicos de cartílago maduro, tales como colágeno II y agregano. Estas observaciones estaban de acuerdo con los resultados de los ensayos cuantitativos de

dichos componentes, revelando que las matrices eran ricas en colágeno (430 µg/mg para MECc y 760 µg/mg para MECm), siendo el 70 % de este contenido colágeno II en matriz de condrocitos, a diferencia de MECm que era solo del 2,45 % (Figura D). A su vez, el contenido de GAG expresó valores de aproximadamente 60 µg/mg en MECc y 47 µg/mg en MECm (Figura 2 D, E).

Con el fin de obtener más detalles sobre los componentes de MECm los presentes inventores realizaron una caracterización por espectrometría de masas (Tabla 3). Los resultados revelaron la presencia de una matriz proteínica compleja, identificando 100 proteínas que incluían matrisoma núcleo y proteínas asociadas a matrisoma. El matrisoma núcleo, que consiste en proteínas estructurales que confieren propiedades mecánicas y adhesión celular a la MEC, era el componente principal. Éste era rico en colágenos, glicoproteínas y proteoglicanos. Se identificó una gran diversidad de colágenos, la mayoría de ellos constituyentes de MEC cartilaginosa. Había algunos miembros de la familia fibrilar (colágeno de tipo I, III y V), colágenos asociados a fibrillas con hélices triples interrumpidas (FACIT) (colágenos de tipo XII, XIV y XIV) y colágenos formadores de redes (colágeno de tipo IV y VIII). También había presentes otros subtipos de colágeno tales como el colágeno de tipo VI, que es el colágeno primario ubicado en la matriz pericelular del cartílago. Entre las glicoproteínas, se encontraron algunos marcadores de matriz de CMM similares a Emilina-1, pero también proteínas estructurales típicas de la matriz del cartílago tales como proteína de matriz oligomérica de cartílago (COMP), tenascina-C, lumicano (LUM), proteína núcleo 2 de proteoglicano de sulfato de condroitina (CSPG2 o versicano), prolargina (PRELP) y proteína inducida por factor de crecimiento transformante beta, aunque la más detectada fue la fibronectina. El biglicano, la decorina y la proteína de núcleo de versicano, que también son muy comunes en el cartílago, fueron los principales proteoglicanos en la presente MECm. En menor abundancia se identificaron otras proteínas afiliadas, incluyendo reguladoras, por ejemplo, metaloproteinasas de matriz (MMP) y sus inhibidores (TIMP), proteínas asociadas a MEC (es decir, anexinas y galectinas) y ligandos de señalización (Tabla 3).

Nombre de la proteína	Número de acceso	Puntuación	Cobertura de la secuencia	N.º de péptidos
Colágenos				
Cadena de colágeno alfa-1 (I) NO = Homo sapiens NG = COL1A1 EP = 1 VS = 5	P02452	27,13	16,05	16
Cadena de colágeno alfa-2 (I) NO = Homo sapiens NG = COL1A2 EP = 1 VS = 7	P08123	42,96	24,01	22
Cadena de colágeno alfa-1 (IV) NO = Homo sapiens NG = COL4A1 EP = 1 VS = 3	P02462	140	3	4
Cadena de colágeno alfa-2 (IV) NO = Homo sapiens NG = COL4A2 EP = 1 VS = 4	P08572	370	7	7
Cadena de colágeno alfa-3 (VI) NO = Homo sapiens NG = COL6A3 EP = 1 VS = 5	P12111	32978	60	147
Cadena de colágeno alfa-1 (III) NO = Homo sapiens NG = COL3A1 EP = 1 VS = 4	P02461	20,18	10,64	11
Cadena de colágeno alfa-2 (V) NO = Homo sapiens NG = COL5A2 EP = 1 VS = 3	P05997	486	8	8
Cadena de colágeno alfa-1 (V) NO = Homo sapiens NG = COL5A1 EP = 1 VS = 3	P20908	2543	15	18
Cadena de colágeno alfa-1 (VI) NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = COL6A1 EP = 1 VS = 3	P12109	91,69	22,47	16
Cadena de colágeno alfa-2 (VI) NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = COL6A2 EP = 1 VS = 4	P12110	60,68	18,94	14
Cadena de colágeno alfa-1 (VIII) NO = Homo sapiens NG = COL8A1 EP = 1 VS = 2	P27658	64	6	3
Cadena de colágeno alfa-1 (XII) NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = COL12A1 EP = 1 VS = 2	Q99715	99,89	18,77	44
Cadena de colágeno alfa-1 (VII) NO = Homo sapiens NG = COL7A1 EP = 1 VS = 2	Q02388	51	1	1
Cadena de colágeno alfa-2 (VIII) NO = Homo sapiens NG = COL8A2 EP = 1 VS = 2	P25067	16	7	2
Cadena de colágeno alfa-1 (XI) NO = Homo sapiens NG = COL11A1 EP = 1 VS = 4	P12107	360	8	11

Nombre de la proteína	Número de acceso	Puntuación	Cobertura de la secuencia	N.º de péptidos
Cadena de colágeno alfa-1 (XIV) NO = Homo sapiens NG = COL14A1 EP = 1 VS = 3	Q05707	2340	42	50
Cadena de colágeno alfa-1 (XVI) NO = Homo sapiens NG = COL16A1 EP = 1 VS = 2	Q07092	58	2	2
Cadena de colágeno alfa-1 (XXI) NO = Homo sapiens NG = COL21A1 EP = 2 VS = 1	Q96P44	93	7	5
Glicoproteínas				
Fibulina-1 NO = Homo sapiens NG = FBLN1 EP = 1 VS = 4	P23142	959	25	13
Fibulina-2 NO = Homo sapiens NG = FBLN2 EP = 1 VS = 2	P98095	1468	29	25
Filamina-A NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = FLNA EP = 1 VS = 4	P21333	54,43	15,00	28
EMILINA-1 NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = EMILIN1 EP = 1 VS = 3	Q9Y6C2	32,00	12,80	9
EMILINA-2 NO = Homo sapiens NG = EMILINA2 EP = 1 VS = 3	Q9BXX0	316	15	10
Fibronectina NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = FN1 EP = 1 VS = 4	P02751	294,06	44,17	65
Fibromodulina NO = Homo sapiens NG = FMOD EP = 1 VS = 2	Q06828	231	21	5
Proteína de matriz oligomérica de cartílago NO = Homo sapiens NG = COMP EP = 1 VS = 2	P49747	1060	29	15
Proteína 1 de capa intermedia de cartílago NO = Homo sapiens NG = CILP EP = 1 VS = 4	O75339	893	27	28
Proteína 2 de capa intermedia de cartílago NO = Homo sapiens NG = CILP2 EP = 2 VS = 2	Q8IUL8	0	1	1
Proteína 1 similar a quitinasa-3 NO = Homo sapiens NG = CHI3L1 EP = 1 VS = 2	P36222	88	21	7
Periostina NO = Homo sapiens NG = POSTN EP = 1 VS = 2	Q15063	7739	66	48
Trombospondina-1 NO = Homo sapiens NG = THBS1 EP = 1 VS = 2	P07996	26485	60	64
Trombospondina-2 NO = Homo sapiens NG = THBS2 EP = 1 VS = 2	P35442	3219	28	25

Nombre de la proteína	Número de acceso	Puntuación	Cobertura de la secuencia	N.º de péptidos
Tenascina NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = TNC EP = 1 VS = 3	P24821	96,80	26,90	40
Subunidad beta-2 de laminina NO = Homo sapiens NG = LAMB2 EP = 1 VS = 2	P55268	159	5	5
Subunidad alfa-4 de laminina NO = Homo sapiens NG = LAMA4 EP = 1 VS = 4	Q16363	0	0	1
Subunidad gamma-1 de laminina NO = Homo sapiens NG = LAMC1 EP = 1 VS = 3	P11047	128	2	3
SPARC NO = Homo sapiens NG = SPARC EP = 1 VS = 1	P09486	155	17	4
Proteína 1 de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF NO = Homo sapiens NG = EFEMP1 EP = 1 VS = 2	Q12805	138	15	5
Proteína 2 de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF NO = Homo sapiens NG = EFEMP2 EP = 1 VS = 3	O95967	120	12	4
Vitronectina NO = Homo sapiens NG = VTN EP = 1 VS = 1	P04004	94	3	1
Lactadherina NO = Homo sapiens NG = MFGE8 EP = 1 VS = 2	Q08431	28	6	2
Podocano NO = Homo sapiens NG = PODN EP = 1 VS = 2	Q7Z5L7	0	2	1
Proteína 3 similar a olfactomedina NO = Homo sapiens NG = OLFML3 EP = 2 VS = 1	Q9NRN5	26	2	1
Miembro 2 de la familia 1D de secretoglobina NO = Homo sapiens NG = SCGB1D2 EP = 2 VS = 1	O95969	22	10	1
Semaforina-3C NO = Homo sapiens NG = SEMA3C EP = 2 VS = 2	Q99985	0	1	1
Tiroglobulina NO = Homo sapiens NG = TG EP = 1 VS = 5	P01266	0	1	1
Proteoglicanos				
Proteína de núcleo de proteoglicano de sulfato de heparano específica de membrana basal NO = Homo sapiens NG = HSPG2 EP = 1 VS =	P98160	64,80	10,18	34

Nombre de la proteína	Número de acceso	Puntuación	Cobertura de la secuencia	N.º de péptidos
4				
Biglicano NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = BGN EP = 1 VS = 2	P21810	19,54	28,26	8
Proteína de núcleo de versicano NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = VCAN EP = 1 VS = 3	P13611	12,67	1,77	5
Decorina NO = Homo sapiens NG = DCN EP = 1 VS = 1	P07585	804	31	8
Lumicano NO = Homo sapiens NG = LUM EP = 1 VS = 2	P51884	533	35	9
Mimecano NO = Homo sapiens NG = ONG EP = 1 VS = 1	P20774	102	17	4
Reguladores				
Metaloproteínasa de matriz-14 NO = Homo sapiens NG = MMP14 EP = 1 VS = 3	P50281	119	13	6
Una desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombosponina 4 NO = Homo sapiens NG = ADAMTS4 EP = 1 VS = 3	O75173	95	4	2
Una desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombosponina 3 NO = Homo sapiens NG = ADAMTS3 EP = 2 VS = 4	O15072	41	2	1
Una desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombosponina 2 NO = Homo sapiens NG = ADAMTS2 EP = 2 VS = 2	O95450	34	3	3
Inhibidor 1 de metaloproteínasa NO = Homo sapiens NG = TIMP1 EP = 1 VS = 1	P01033	30	8	1
Inhibidor 3 de metaloproteínasa NO = Homo sapiens NG = TIMP3 EP = 1 VS = 2	P35625	55	5	1
Colagenasa de tipo IV de 72 kDa NO = Homo sapiens NG = MMP2 EP = 1 VS = 2	P08253	271	22	10
Colagenasa intersticial NO = Homo sapiens NG = MMP1 EP = 1 VS = 3	P03956	48	3	1
Proteína 5 asociada a remodelación de la matriz NO = Homo sapiens NG = MXRA5 EP = 2 VS = 3	Q9NR99	1,90	0,35	1
Proteína 7 asociada a remodelación de la	P84157	1,82	5,39	1

Nombre de la proteína	Número de acceso	Puntuación	Cobertura de la secuencia	N.º de péptidos
matriz NO = Homo sapiens NG = MXRA7 EP = 1 VS = 1				
Proteína de unión a hialuronano e inductora de migración celular NO = Homo sapiens NG = CEMIP EP = 1 VS = 2	Q8WUJ3	74	4	4
Proteína 14-3-3 épsilon NO = Homo sapiens NG = YWHA E EP = 1 VS = 1	P62258	28,79	66,67	16
Proteína 14-3-3 zeta/delta NO = Homo sapiens NG = YWHA Z EP = 1 VS = 1	P63104	21,58	57,96	12
Proteína 14-3-3 beta/alfa NO = Homo sapiens NG = YWHA B EP = 1 VS = 3	P31946	13,40	60,16	8
Proteína 14-3-3 theta NO = Homo sapiens NG = YWHA Q EP = 1 VS = 1	P27348	12,00	45,71	6
Proteína 14-3-3 gamma NO = Homo sapiens NG = YWHA G EP = 1 VS = 2	P61981	9,92	49,80	5
Proteína 14-3-3 eta NO = Homo sapiens NG = YWHA H EP = 1 VS = 4	Q04917	8,97	39,02	5
Proteína 1 que contiene repetición de triple hélice de colágeno NO = Homo sapiens NG = CTHRC1 EP = 1 VS = 1	Q96CG8	36	3	1
Dermcidina NO = Homo sapiens NG = DCD EP = 1 VS = 2	P81605	3,33	20,00	2
Serina proteasa HTRA1 NO = Homo sapiens NG = HTRA1 EP = 1 VS = 1	Q92743	8,57	18,75	5
Proteínas afiliadas a la MEC				
Proteína 1 de unión al factor de crecimiento transformador latente beta NO = Homo sapiens NG = LTBP1 EP = 1 VS = 4	Q14766	269	7	8
Prolargina NO = Homo sapiens NG = PRELP EP = 1 VS = 1	P51888	204	23	7
Proteína 2 asociada a microfibrillas NO = Homo sapiens NG = MFAP2 EP = 2 VS = 1	P55001	457	27	4
Proteína 5 asociada a microfibrillas NO = Homo sapiens NG = MFAP5 EP = 1 VS = 1	Q13361	157	18	3
Proteína ig-h3 inducida por factor de	Q15582	47,51	48,90	24

Nombre de la proteína	Número de acceso	Puntuación	Cobertura de la secuencia	N.º de péptidos
crecimiento transformante beta NO = Homo sapiens NG = TGFBI EP = 1 VS = 1				
Proteína asociada a cartílago NO = Homo sapiens NG = CRTAP EP = 1 VS = 1	O75718	13,32	21,95	7
Potenciador 1 de procolágeno C-endopeptidasa NO = Homo sapiens NG = PCOLCE EP = 1 VS = 2	Q15113	6,33	17,82	5
Anexina A6 NO = Homo sapiens NG = ANXA6 EP = 1 VS = 3	P08133	71,69	63,00	35
Anexina A2 NO = Homo sapiens NG = ANXA2 EP = 1 VS = 2	P07355	52,03	72,86	34
Anexina A5 NO = Homo sapiens NG = ANXA5 EP = 1 VS = 2	P08758	47,48	70,00	27
Anexina A1 NO = Homo sapiens NG = ANXA1 EP = 1 VS = 2	P04083	36,12	60,98	18
Anexina A4 NO = Homo sapiens NG = ANXA4 EP = 1 VS = 4	P09525	22,43	47,65	12
Anexina A7 NO = Homo sapiens NG = ANXA7 EP = 1 VS = 3	P20073	16,54	20,70	9
Anexina A11 NO = Homo sapiens NG = ANXA11 EP = 1 VS = 1	P50995	10,33	14,65	6
Galectina-1 NO = Homo sapiens NG = LGALS1 EP = 1 VS = 2	P09382	14,45	70,37	8
Galectina-3 NO = Homo sapiens NG = LGALS3 EP = 1 VS = 5	P17931	1,88	14,00	3
Proteína CYR61 NO = Homo sapiens NG = CYR61 EP = 1 VS = 1	O00622	2,13	3,41	1
Factores secretados				
Factor de crecimiento derivado de mieloides NO = Homo sapiens NG = MYDGF EP = 1 VS = 1	Q969H8	11,46	37,57	6
Proteína 2 de unión a ARNm de factor de crecimiento similar a insulina 2 NO = Homo sapiens NG = IGF2BP2 EP = 1 VS = 2	Q9Y6M1	6,52	10,85	5
Factor de crecimiento derivado de hepatoma	P51858	3,36	17,92	3

Nombre de la proteína	Número de acceso	Puntuación	Cobertura de la secuencia	N.º de péptidos
NO = Homo sapiens NG = HDGF EP = 1 VS = 1				
Factor de crecimiento de tejido conectivo NO = Homo sapiens NG = CTGF EP = 1 VS = 2	P29279	2,68	6,30	2
Proteína 1 de unión a guanilato NO = Homo sapiens NG = GBP1 EP = 1 VS = 2	P32455	2,19	5,07	2
Proteína PTX3 relacionada con pentraxina NO = Homo sapiens NG = PTX3 EP = 1 VS = 3	P26022	5,69	13,39	4
Inhibidor de elastasa leucocitaria NO = Homo sapiens NG = SERPINB1 EP = 1 VS = 1	P30740	4,82	7,92	3
Factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos NO = Homo sapiens NG = MANF EP = 1 VS = 3	P55145	3,19	21,43	3
Espondina-1 NO = Homo sapiens NG = SPON1 EP = 1 VS = 2	Q9HCB6	30	1	1
Proteína SRPX que contiene repeticiones sushi NO = Homo sapiens NG = SRPX EP = 1 VS = 1	P78539	90	8	3
Proteína SRPX2 que contiene repeticiones sushi NO = Homo sapiens NG = SRPX2 EP = 1 VS = 1	O60687	23	3	1

Tabla 3. Proteínas detectables en la MECm condrogénica temprana.

2.2. Diferenciación celular

- 5 La Figura 3 muestra la diferenciación satisfactoria de linajes celulares. En ella pueden observarse los resultados de diferentes tinciones que sirven para caracterizar el tipo celular existente.

10 En la primera columna, existe un marcaje positivo de colágeno por tinción con rojo sirio en CMM en diferenciación → FB, con un patrón similar al de las CMM indiferenciadas y los FB. En la segunda columna, se muestran imágenes de tinción con azul de toluidina que indican la existencia de proteoglicanos, que por lo general existen en el cartílago joven o en la matriz inmadura, destacando en las CMM sobre el resto. Se usa azul alciano para el marcaje de glicosaminoglicanos, que se expresan en mayor medida en CMM, CMM → FB y

FB. En el tejido graso, sin embargo, la tinción utilizada es rojo de aceite, un marcador de triglicéridos y lipoproteínas que puede observarse en la diferenciación de CMM → A. Y como marcador inmunofluorescente, la vimentina se expresa más intensamente en FB y CMM → FB ya que es un marcador de células de origen mesenquimal que están en transición epitelio-mesénquima.

2.3. Descelularización de la matriz

Se realizó la retirada de células de la matriz condrogénica temprana para maximizar la eliminación de material celular, minimizando al mismo tiempo la pérdida y el daño de la MEC. El tratamiento que contenía Triton X-100 y NH₄OH eliminó satisfactoriamente el contenido celular, como demostró la ausencia de núcleos en imágenes de contraste de fases y en secciones teñidas con HyE de matriz descelularizada (Figura 6A), así como la reducción del ~98 % del contenido de ADN (Figura 6B).

En paralelo, se demostró que la composición de la MEC se conservó adecuadamente. La información comparativa sobre el contenido de proteínas por espectrometría de masas reveló patrones similares antes y después del tratamiento de descelularización (Tabla 4). De forma similar, un análisis histológico usando tinción con tricrómico de Masson y toluidina O y ensayos bioquímicos cuantitativos de colágeno y GAG, respectivamente, también mostraron las diferencias no significativas en el contenido remanente entre MECm y MECdm (Figura 6 C, D).

Las MECd obtenidas a partir de FB y CMM diferenciadas a adipocitos y FB se caracterizaron histológicamente, mostrando una tinción fuerte para colágeno, glicosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos (PG), así como que se descelularizaron correctamente, ya que no quedaban rastros celulares notables (Figuras 4 y 5). En la comparación de la dermis nativa y descelularizada, puede observarse una diferencia ligera en la tinción de colágenos, GAG y PG, ya que el proceso de descelularización tuvo una repercusión menor en la estructura del tejido. Análogamente, la comparación entre matrices descelularizadas y tejido nativo muestra que las MECdm y las MECdf, eran ricos en componentes de sus tejidos nativos correspondientes.

Nombre de la proteína	MECm	MECdm
Colágenos		
Cadena de colágeno alfa-1 (I) NO = Homo sapiens NG = COL1A1 EP = 1 VS = 5	X	X

Nombre de la proteína	MECm	MECdm
Cadena de colágeno alfa-2 (I) NO = Homo sapiens NG = COL1A2 EP = 1 VS = 7	X	X
Cadena de colágeno alfa-1 (IV) NO = Homo sapiens NG = COL4A1 EP = 1 VS = 3	X	X
Cadena de colágeno alfa-2 (IV) NO = Homo sapiens NG = COL4A2 EP = 1 VS = 4	X	X
Cadena de colágeno alfa-3 (VI) NO = Homo sapiens NG = COL6A3 EP = 1 VS = 5	X	X
Cadena de colágeno alfa-1 (III) NO = Homo sapiens NG = COL3A1 EP = 1 VS = 4	X	X
Cadena de colágeno alfa-2 (V) NO = Homo sapiens NG = COL5A2 EP = 1 VS = 3	X	X
Cadena de colágeno alfa-1 (V) NO = Homo sapiens NG = COL5A1 EP = 1 VS = 3	X	X
Cadena de colágeno alfa-1 (VI) NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = COL6A1 EP = 1 VS = 3	X	X
Cadena de colágeno alfa-2 (VI) NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = COL6A2 EP = 1 VS = 4	X	X
Cadena de colágeno alfa-1 (VIII) NO = Homo sapiens NG = COL8A1 EP = 1 VS = 2	X	X
Cadena de colágeno alfa-1 (XII) NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = COL12A1 EP = 1 VS = 2	X	X
Cadena de colágeno alfa-1 (VII) NO = Homo sapiens NG = COL7A1 EP = 1 VS = 2	X	X
Cadena de colágeno alfa-2 (VIII) NO = Homo sapiens NG = COL8A2 EP = 1 VS = 2	X	
Cadena de colágeno alfa-1 (XI) NO = Homo sapiens NG = COL11A1 EP = 1 VS = 4	X	X
Cadena de colágeno alfa-1 (XIV) NO = Homo sapiens NG = COL14A1 EP = 1 VS = 3	X	X
Cadena de colágeno alfa-1 (XVI) NO = Homo sapiens NG = COL16A1 EP = 1 VS = 2	X	X
Cadena de colágeno alfa-1 (XXI) NO = Homo sapiens NG = COL21A1 EP = 2 VS = 1	X	
Glicoproteínas		

Nombre de la proteína	MECm	MECdm
Fibulina-1 NO = Homo sapiens NG = FBLN1 EP = 1 VS = 4	X	X
Fibulina-2 NO = Homo sapiens NG = FBLN2 EP = 1 VS = 2	X	X
Filamina-A NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = FLNA EP = 1 VS = 4	X	X
EMILINA-1 NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = EMILIN1 EP = 1 VS = 3	X	X
EMILINA-2 NO = Homo sapiens NG = EMILIN2 EP = 1 VS = 3	X	X
Fibronectina NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = FN1 EP = 1 VS = 4	X	X
Fibromodulina NO = Homo sapiens NG = FMOD EP = 1 VS = 2	X	X
Proteína de matriz oligomérica de cartílago NO = Homo sapiens NG = COMP EP = 1 VS = 2	X	X
Proteína 1 de capa intermedia de cartílago NO = Homo sapiens NG = CILP EP = 1 VS = 4	X	X
Proteína 2 de capa intermedia de cartílago NO = Homo sapiens NG = CILP2 EP = 2 VS = 2	X	X
Proteína 1 similar a quitinasa-3 NO = Homo sapiens NG = CHI3L1 EP = 1 VS = 2	X	X
Periostina NO = Homo sapiens NG = POSTN EP = 1 VS = 2	X	X
Trombospondina-1 NO = Homo sapiens NG = THBS1 EP = 1 VS = 2	X	X
Trombospondina-2 NO = Homo sapiens NG = THBS2 EP = 1 VS = 2	X	X
Tenascina NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = TNC EP = 1 VS = 3	X	X
Subunidad beta-2 de laminina NO = Homo sapiens NG = LAMB2 EP = 1 VS = 2	X	X
Subunidad alfa-4 de laminina NO = Homo sapiens NG = LAMA4 EP = 1 VS = 4	X	X
Subunidad gamma-1 de laminina NO = Homo sapiens NG = LAMC1 EP = 1 VS = 3	X	X
SPARC NO = Homo sapiens NG = SPARC EP = 1 VS = 1	X	X
Proteína 1 de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF NO = Homo sapiens NG = EFEMP1 EP = 1 VS = 2	X	X
Proteína 2 de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF NO = Homo sapiens NG = EFEMP2 EP = 1 VS = 3	X	X
Vitronectina NO = Homo sapiens NG = VTN EP = 1 VS = 1	X	X
Lactadherina NO = Homo sapiens NG = MFGE8 EP = 1 VS = 2	X	X
Podocano NO = Homo sapiens NG = PODN EP = 1 VS = 2	X	X
Proteína 3 similar a olfactomedina NO = Homo sapiens NG = OLFML3 EP = 2 VS = 1	X	X

Nombre de la proteína	MECm	MECdm
Miembro 2 de la familia 1D de secretoglobina NO = Homo sapiens NG = SCGB1D2 EP = 2 VS = 1	X	X
Semaforina-3C NO = Homo sapiens NG = SEMA3C EP = 2 VS = 2	X	X
Tiroglobulina NO = Homo sapiens NG = TG EP = 1 VS = 5	X	X
Proteoglicanos		
Proteína de núcleo de proteoglicano de sulfato de heparano específica de membrana basal NO = Homo sapiens NG = HSPG2 EP = 1 VS = 4	X	X
Biglicano NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = BGN EP = 1 VS = 2	X	X
Proteína de núcleo de versicano NO = Homo sapiens IO = 9606 NG = VCAN EP = 1 VS = 3	X	X
Decorina NO = Homo sapiens NG = DCN EP = 1 VS = 1	X	X
Lumicano NO = Homo sapiens NG = LUM EP = 1 VS = 2	X	X
Mimecano NO = Homo sapiens NG = ONG EP = 1 VS = 1	X	X
Reguladores		
Metaloproteinasa de matriz-14 NO = Homo sapiens NG = MMP14 EP = 1 VS = 3	X	X
Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombosponina 4 NO = Homo sapiens NG = ADAMTS4 EP = 1 VS = 3	X	X
Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombosponina 3 NO = Homo sapiens NG = ADAMTS3 EP = 2 VS = 4	X	X
Una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombosponina 2 NO = Homo sapiens NG = ADAMTS2 EP = 2 VS = 2	X	X
Inhibidor 1 de metaloproteinasa NO = Homo sapiens NG = TIMP1 EP = 1 VS = 1	X	X
Inhibidor 3 de metaloproteinasa NO = Homo sapiens NG = TIMP3 EP = 1 VS = 2	X	X
Colagenasa de tipo IV de 72 kDa NO = Homo sapiens NG = MMP2 EP = 1 VS = 2	X	X
Colagenasa intersticial NO = Homo sapiens NG = MMP1 EP = 1 VS = 3	X	X
Proteína 5 asociada a remodelación de la matriz NO = Homo sapiens NG = MXRA5 EP = 2 VS = 3	X	X
Proteína 7 asociada a remodelación de la matriz NO = Homo sapiens NG = MXRA7 EP = 1 VS = 1	X	
Proteína de unión a hialuronano e inductora de migración celular NO =	X	X

Nombre de la proteína	MECm	MECdm
Homo sapiens NG = CEMIP EP = 1 VS = 2		
Proteína 14-3-3 épsilon NO = Homo sapiens NG = YWHAE EP = 1 VS = 1	X	X
Proteína 14-3-3 zeta/delta NO = Homo sapiens NG = YWHAZ EP = 1 VS = 1	X	X
Proteína 14-3-3 beta/alfa NO = Homo sapiens NG = YWHAB EP = 1 VS = 3	X	X
Proteína 14-3-3 theta NO = Homo sapiens NG = YWHAQ EP = 1 VS = 1	X	X
Proteína 14-3-3 gamma NO = Homo sapiens NG = YWHAG EP = 1 VS = 2	X	X
Proteína 14-3-3 eta NO = Homo sapiens NG = YWHAH EP = 1 VS = 4	X	X
Proteína 1 que contiene repetición de triple hélice de colágeno NO = Homo sapiens NG = CTHRC1 EP = 1 VS = 1	X	X
Dermcidina NO = Homo sapiens NG = DCD EP = 1 VS = 2	X	X
Serina proteasa HTRA1 NO = Homo sapiens NG = HTRA1 EP = 1 VS = 1	X	
Proteínas afiliadas a la MEC		
Proteína 1 de unión al factor de crecimiento transformante beta latente NO = Homo sapiens NG = LTBP1 EP = 1 VS = 4	X	X
Prolargina NO = Homo sapiens NG = PRELP EP = 1 VS = 1	X	X
Proteína 2 asociada a microfibrillas NO = Homo sapiens NG = MFAP2 EP = 2 VS = 1	X	X
Proteína 5 asociada a microfibrillas NO = Homo sapiens NG = MFAP5 EP = 1 VS = 1	X	X
Proteína ig-h3 inducida por factor de crecimiento transformante beta NO = Homo sapiens NG = TGFBI EP = 1 VS = 1	X	X
Proteína asociada a cartílago NO = Homo sapiens NG = CRTAP EP = 1 VS = 1	X	X
Potenciador 1 de procolágeno C-endopeptidasa NO = Homo sapiens NG = PCOLCE EP = 1 VS = 2	X	X
Anexina A6 NO = Homo sapiens NG = ANXA6 EP = 1 VS = 3	X	X
Anexina A2 NO = Homo sapiens NG = ANXA2 EP = 1 VS = 2	X	X
Anexina A5 NO = Homo sapiens NG = ANXA5 EP = 1 VS = 2	X	X
Anexina A1 NO = Homo sapiens NG = ANXA1 EP = 1 VS = 2	X	X
Anexina A4 NO = Homo sapiens NG = ANXA4 EP = 1 VS = 4	X	

Nombre de la proteína	MECm	MECdm
Anexina A7 NO = Homo sapiens NG = ANXA7 EP = 1 VS = 3	X	
Anexina A11 NO = Homo sapiens NG = ANXA11 EP = 1 VS = 1	X	
Galectina-1 NO = Homo sapiens NG = LGALS1 EP = 1 VS = 2	X	X
Galectina-3 NO = Homo sapiens NG = LGALS3 EP = 1 VS = 5	X	X
Proteína CYR61 NO = Homo sapiens NG = CYR61 EP = 1 VS = 1	X	X
Factores secretados		
Factor de crecimiento derivado de mieloides NO = Homo sapiens NG = MYDGF EP = 1 VS = 1	X	
Proteína 2 de unión a ARNm de factor de crecimiento insulínico tipo 2 NO = Homo sapiens NG = IGF2BP2 EP = 1 VS = 2	X	X
Factor de crecimiento derivado de hepatoma NO = Homo sapiens NG = HDGF EP = 1 VS = 1	X	
Factor de crecimiento de tejido conectivo NO = Homo sapiens NG = CTGF EP = 1 VS = 2	X	
Proteína 1 de unión a guanilato NO = Homo sapiens NG = GBP1 EP = 1 VS = 2	X	
Proteína PTX3 relacionada con pentraxina NO = Homo sapiens NG = PTX3 EP = 1 VS = 3	X	X
Inhibidor de elastasa leucocitaria NO = Homo sapiens NG = SERPINB1 EP = 1 VS = 1	X	
Factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos NO = Homo sapiens NG = MANF EP = 1 VS = 3	X	
Espondina-1 NO = Homo sapiens NG = SPON1 EP = 1 VS = 2	X	
Proteína SRPX que contiene repeticiones sushi NO = Homo sapiens NG = SRPX EP = 1 VS = 1	X	X
Proteína SRPX2 que contiene repeticiones sushi NO = Homo sapiens NG = SRPX2 EP = 1 VS = 1	X	X

Tabla 4. Proteínas detectables en MECm antes y después del proceso de descelularización

5 Las MECd obtenidas de tejido adiposo usando los tres protocolos de descelularización muestran una tinción fuerte para colágeno, glicosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos (PG), así como que se descelularizaron correctamente, ya que no quedaban rastros celulares notables (Figura 10). Sin embargo, puede observarse una presencia mayor de GAG en las MECd obtenidas mediante el protocolo 2, lo que sugiere que este protocolo conserva mejor los componentes del tejido nativo que los otros.

2.4. Formulación de hidrogel de MECdm

Después de la descelularización, la MECdm condrogénica temprana se liofilizó, se molió hasta convertirla en un polvo de color blanco fino y después se solubilizó con pepsina para licuarla a concentraciones finales del 3 y el 6 % p/v (Figura 7A). Las soluciones de MECdm ácidas homogéneas resultantes se ajustaron al pH fisiológico usando una solución básica (NaOH) antes de encapsular las células. Las soluciones de MECdm neutralizadas presentaban un aspecto similar a viscoso con una gran opacidad que aumentó con la concentración. Estas soluciones eran termosensibles; comportándose como un líquido viscoso a temperaturas bajas ($<15^{\circ}\text{C}$) y transformándose en un gel cuando se incubaron durante 20 minutos a 37°C .

2.5. Caracterización de hidrogel de MECdm

Los presentes inventores usaron MEB para examinar la ultraestructura del hidrogel de MECdm a 37°C . Las micrografías mostraron que el gel generado presentaba un aspecto similar a esponja 3D con una estructura nanofibrilar orientada aleatoriamente, típica de geles basados en MEC descelularizada (Figura 7B). Los hidrogeles de MECdm al 3 % y al 6 % parecían visualmente similares a un sistema microporoso homogéneo, aunque la densidad fibrilar y la interconectividad fueron mayores con el aumento de la concentración (Figura 7E). Se formaron poros de $2,72 \pm 1,54 \mu\text{m}$ de diámetro dentro de la MECdm al 3 % y de $1,35 \pm 0,77 \mu\text{m}$ en la MECdm al 6 %.

Las capacidades de inyectabilidad y de gelificación del hidrogel, de MECdm al 3 % y al 6 %, se analizaron usando cizalla estacionaria, flujos intermitentes y experimentos de oscilación dinámica. La Figura 7C muestra las curvas de viscosidad para los hidrogeles de MECdm a 15°C . Como se observa, los hidrogeles presentan un comportamiento de adelgazamiento por cizalla muy fuerte. Esto se evidencia por la disminución de la viscosidad con la velocidad de cizalla, con valores que varían de $39,65 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ y $40,1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ a una velocidad de cizalla de $0,01 \text{ s}^{-1}$ a $0,0057 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ y $0,0113 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ a una velocidad de cizalla de 1000 s^{-1} para MECdm al 3 y al 6 %, respectivamente. Como cabía esperar, cuanto mayor es la concentración de la matriz, mayor es la viscosidad. También es importante destacar que las curvas se superponen cuando se realizan barridos de velocidad de cizalla ascendente y descendente. Esto indica que la muestra es tixotrópica.

La Figura 7D muestra los transitorios de viscosidad con cambios bruscos de la velocidad de cizalla a 15°C . Los resultados muestran que los transitorios son extraordinariamente cortos y las muestras responden muy rápidamente (tiempos de relajación $\approx 1 \text{ s}$) a la excitación; a

velocidades de cizalla tanto grandes como pequeñas. Esto concuerda con el hecho de que las curvas de cizalla estacionaria ascendente y descendente se superponen en la Figura 7C.

La gelificación impulsada por calor de las suspensiones se muestra en la Figura 7E. Esta Figura representa los módulos viscoelásticos lineales (módulo de almacenamiento G' y módulo de pérdida G'') como función de la temperatura en el intervalo que varía de 20 °C a 40 °C. Independientemente de la concentración y la temperatura, el módulo de almacenamiento sigue siendo siempre superior al módulo de pérdida, lo que evidencia la existencia de una estructura similar a gel en el intervalo de temperaturas investigado. Sin embargo, a una temperatura particular de aproximadamente 35 °C, los módulos viscoelásticos aumentan adicionalmente debido al autoensamblaje de los componentes principales de la matriz, tales como las fibras de colágeno o la fibronectina, entre otros.

La Figura 7F muestra el factor de pérdida (G''/G') de los hidrogeles como una función de la temperatura. El factor de pérdida es una medida de la importancia relativa de la disipación viscosa sobre la recuperación elástica de las muestras. Independientemente de la concentración, el factor de pérdida es siempre inferior a uno, como se espera de la formación de un gel ($G' > G''$). El factor de pérdida disminuye drásticamente para temperaturas superiores a 35 °C. Cabe destacar que, al contrario de lo que ocurre con los módulos viscoelásticos, el factor de pérdida es independiente de la concentración.

2.6. Biocompatibilidad del hidrogel de MECdm

Se evaluó la viabilidad y la proliferación celulares de CMM encapsuladas dentro de los hidrogeles de MECdm al 3 y al 6 % respectivamente durante 28 días de cultivo. La supervivencia celular se sometió a ensayo usando una tinción Viva/Muerta usando microscopía confocal. Las imágenes evidenciaron que las células se distribuyeron homogéneamente por todo el hidrogel y mantuvieron la morfología redondeada en ambas concentraciones de MECdm y durante todo el período de cultivo (Figura 8A). Los resultados mostraron que más del 90 % de las CMM incrustadas dentro de los hidrogeles de MECdm al 3 y al 6 % eran viables (día 1), sin diferencias notables entre ellas. Esta viabilidad alta se mantuvo a lo largo del tiempo en el hidrogel de MECdm al 6 %, mientras tanto, en la MECdm del 3 % se observó un menor número de células vivas al final del período de cultivo, aunque este valor (83,3 %) también fue indicativo de una viabilidad celular alta (Figura 8B).

Por otro lado, el ensayo con azul de alamar reveló una tendencia a mantener la proliferación celular a lo largo del tiempo de cultivo en ambas concentraciones. En la MECdm al 3 % esta tendencia se produjo desde el principio, mostrando una reducción ligera de la proliferación

celular entre el día 5 y el día 7. A su vez, la velocidad de proliferación en la MECdm al 6 % se mantuvo después de tres días de cultivo y disminuyó hasta el día 14 a un nivel similar al de la MECdm al 3 % (Figura 8C). En conjunto, estos resultados indican que el nuevo hidrogel biomimético a base de MECdm proporcionó un entorno favorable para las células, sustentando una viabilidad celular alta a diferentes concentraciones de MECdm.

2.7. Diferenciación condrogénica de hidrogel biomimético de MECdm cargado con CMM

Se investigó la condroinductividad del hidrogel de MECdm mediante el análisis de la expresión génica de las CMM incrustadas durante 1 mes en cultivo sin ningún factor inductor en el medio (Figura 8D). Los resultados de la qPCR evidenciaron un aumento constante de la expresión de los marcadores condrogénicos y una disminución de los marcadores no condrogénicos a lo largo del tiempo. Se observaron niveles altos de los genes COL2A1 y ACAN el día 14 en las CMM incrustadas en hidrogeles de MECdm al 3 % y al 6 %, sin diferencias significativas entre las concentraciones, en comparación con estas células el día 0 de cultivo. El día 28, el aumento de la expresión génica de estos marcadores condrogénicos fue aún más evidente. Los valores elevados de factor inductor condrogénico SOX9 y COL2A1 fueron similares o incluso superiores a los condrocitos de control positivo cultivados durante 2 semanas *in vitro*, respectivamente. Sin embargo, la expresión de ACAN en condrocitos fue significativamente superior a la de las CMM en hidrogeles de MECdm el día 28. Aunque esta regulación positiva parece ser de manera dependiente de la concentración, las diferencias en los niveles de expresión de MECdm entre el 3 % y el 6 % no fueron estadísticamente significativas. También se observó una disminución del gen marcador fibrótico COL1A1 a partir del día 14, y mucho más significativa después de 28 días en ambos hidrogeles en comparación con el día 0, mientras que la expresión del gen marcador hipertrófico COL10A1 fue indetectable desde el principio.

Además, para confirmar los resultados de la expresión génica, los presentes inventores evaluaron la condrogénesis a nivel de proteínas usando técnicas de inmunofluorescencia (Figura 8E). La tinción de inmunofluorescencia reveló la presencia de colágeno de tipo II y colágeno de tipo I después de 14 días de cultivo. De acuerdo con los resultados de la qPCR descritos anteriormente, se observó una buena evolución de la matriz cartilaginosa hialina en el tiempo, con una tinción más positiva para el colágeno de tipo II y menos para el colágeno de tipo I el día 28, sin diferencias apreciables entre las concentraciones. En conjunto, estos resultados indicaron que el ambiente de MECdm promovió el compromiso condrogénico de las CMM y la formación específica de tejido a pesar de la concentración.

2.8. Biocompatibilidad *in vivo* y desarrollo de tejido similar a cartílago de hidrogel de MECdmc

Para evaluar si la MECdmc tendría biocompatibilidad y buena integración *in vivo*, se implantaron hidrogeles por vía subcutánea a ambas concentraciones en regiones dorsales de ratones CD1 inmunocompetentes a lo largo de 4 semanas. La Figura 9A muestra una integración buena de hidrogeles de MECdmc acelular sin aparición de rojez o hinchazón. La tinción con DAPI también reveló infiltración de células circundantes (Figura 9B). El aumento del número de núcleos a lo largo del tiempo indicó que las células eran capaces de adherirse, penetrar y crecer en la estructura 3D de los hidrogeles.

Se determinó la formación de tejido en ratones gamma NOD SCID inmunodeficientes mediante el análisis histológico de hidrogeles de MECdm cargados con CMM al 3 % y al 6 % en comparación con CMM prediferenciadas hacia el linaje condrogénico en microgránulos (Figura 9C). La tinción con HyE mostró que las células en hidrogel de MECdmc adquirieron la forma típica de condrocitos incrustados en lagunas después de 2 semanas *in vivo*, siendo más evidente en la concentración más alta. Usando tinción con toluidina O, se evidenció un aumento en la deposición de GAG, mostrando una tinción intensa en geles de MECdm al 3 % y al 6 % implantados a las cuatro semanas, que fue superior a la observada en el microgránulo de control.

Mediante inmunotinción, se determinaron niveles altos de colágeno de tipo II y niveles bajos de colágeno de tipo I en ambas concentraciones de MECdmc a lo largo del tiempo. En ensayos tanto histológicos como de inmunotinción, los niveles de tinción fueron mayores en los geles de MECdmc que en el microgránulo de control. La tinción con rojo de alizarina/verde claro tampoco reveló la presencia de mineralización en ninguna condición. Estos resultados indican la formación de una matriz cartilaginosa madura en hidrogeles de MECdm, especialmente en MECdmc al 6 %, cuya matriz era más similar al tejido cartilaginoso, y confirman la capacidad de los hidrogeles de MECdmc para inducir tejido similar al cartílago *in vivo*.

2.9 Formulaciones de biotintas basadas en MECd

Después de la descelularización, la MECd derivada de tejido adiposo se liofilizó, se molió hasta convertirla en un polvo de color blanco fino y después se solubilizó para licuarla a una concentración final del 10 % p/v. Las soluciones de MECd ácidas homogéneas resultantes se ajustaron a pH fisiológico usando una solución básica (NaOH). La solución de MECd neutralizada se mezcló con diferentes componentes para evaluar su estabilidad a largo

plazo, inyectabilidad y bioimprimibilidad: gelatina de piel porcina, fibrinógeno del plasma humano o bovino, alginato, metacrilólo de gelatina y hialuronato de sodio intraarticular (Figura 11). Los hidrogeles fueron estables durante dos semanas a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %.

REIVINDICACIONES

1. Un hidrogel biomimético que comprende una matriz extracelular descelularizada derivada de células madre mesenquimales diferenciadas (MECdmd).
- 5 2. El hidrogel biomimético de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre mesenquimales son células madre mesenquimales de mamíferos, preferiblemente células madre mesenquimales humanas.
- 10 3. El hidrogel biomimético de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde las células madre mesenquimales se aíslan de tejido adiposo.
4. El hidrogel biomimético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células madre mesenquimales diferenciadas se seleccionan de la lista que
15 consiste en: células madre mesenquimales condrogénicas tempranas, adipocitos, fibroblastos y osteoblastos.
5. El hidrogel biomimético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende un porcentaje de MECdmd entre el 1 y el 10 % p/v.
- 20 6. El hidrogel biomimético de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el porcentaje de MECdmd es del 3 o del 6 % p/v.
7. Una composición que comprende el hidrogel biomimético de acuerdo con cualquiera
25 de las reivindicaciones 1 a 6.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, que además comprende células madre embrionarias y/o células madre no embrionarias o adultas, preferiblemente células madre mesenquimales.
- 30 9. Un implante que comprende el hidrogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.
10. Un método para producir el hidrogel biomimético de acuerdo con cualquiera de las
35 reivindicaciones 1 a 6 que comprende:
 - (a) cultivar células madre mesenquimales de un sujeto con al menos un compuesto que induce la diferenciación,
 - (b) descelularizar el cultivo de la etapa (a), obteniendo una matriz extracelular

descelularizada derivada de células madre mesenquimales diferenciadas (MECdmd),
 (c) liofilizar la matriz extracelular descelularizada obtenida en la etapa (b),
 (d) solubilizar la matriz extracelular descelularizada liofilizada obtenida en la etapa (c),
 y
 5 (e) gelificar la solución obtenida en la etapa (d) durante 15 a 30 min a 30 a 40 °C.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, que además comprende una etapa adicional (c') de trituración en polvo la matriz extracelular descelularizada liofilizada obtenida en la etapa (c).

12. El método de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde las células madre mesenquimales son de mamífero, preferiblemente de ser humano.

13. El método de acuerdo con las reivindicaciones 10 o 12, en donde las células madre mesenquimales se aíslan de tejido adiposo.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde la etapa (a) se realiza durante al menos una semana, preferiblemente al menos dos semanas.

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde el compuesto que induce la diferenciación de las células madre mesenquimales se selecciona entre la lista que consiste en: dexametasona, TGF-3β.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la concentración de dexametasona es de 100 nM y/o la concentración de TGF-3β es de 10 µg/ml.

17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en donde el tratamiento de descelularización de la etapa (b) se realiza con una solución detergente, preferiblemente seguida de tratamiento con nucleasas.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la solución detergente es Triton X-100 y/o NH₄OH y el tratamiento con nucleasas es desoxirribonucleasa y/o ribonucleasa.

19. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en donde el tratamiento de trituración de la etapa (d) se realiza mediante nitrógeno líquido.

20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19, en donde la

solubilización de la etapa (e) se realiza mediante digestión enzimática, preferiblemente con pepsina.

21. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19, en donde la solubilización de la etapa (e) se realiza mediante tratamiento con urea.

22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 21, en donde el porcentaje de MECdmd es entre el 1 y el 10 % p/v.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el porcentaje de MECdmd es del 3 o del 6 % p/v.

24. El hidrogel biomimético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 o el implante de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso como medicamento.

25. El hidrogel biomimético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 o el implante de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de enfermedades degenerativas.

26. El hidrogel biomimético o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la enfermedad degenerativa se selecciona de la lista que consiste en: osteoartritis, artritis inflamatoria y artritis inducida por cristales.

27. Uso del implante de acuerdo con la reivindicación 9 para la regeneración de tejido u órganos.

28. Uso de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el tejido es piel, hueso, tejido cardíaco, tejido cartilaginoso, tejido vascular.

29. Uso del hidrogel biomimético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 para bioimpresión 3D.

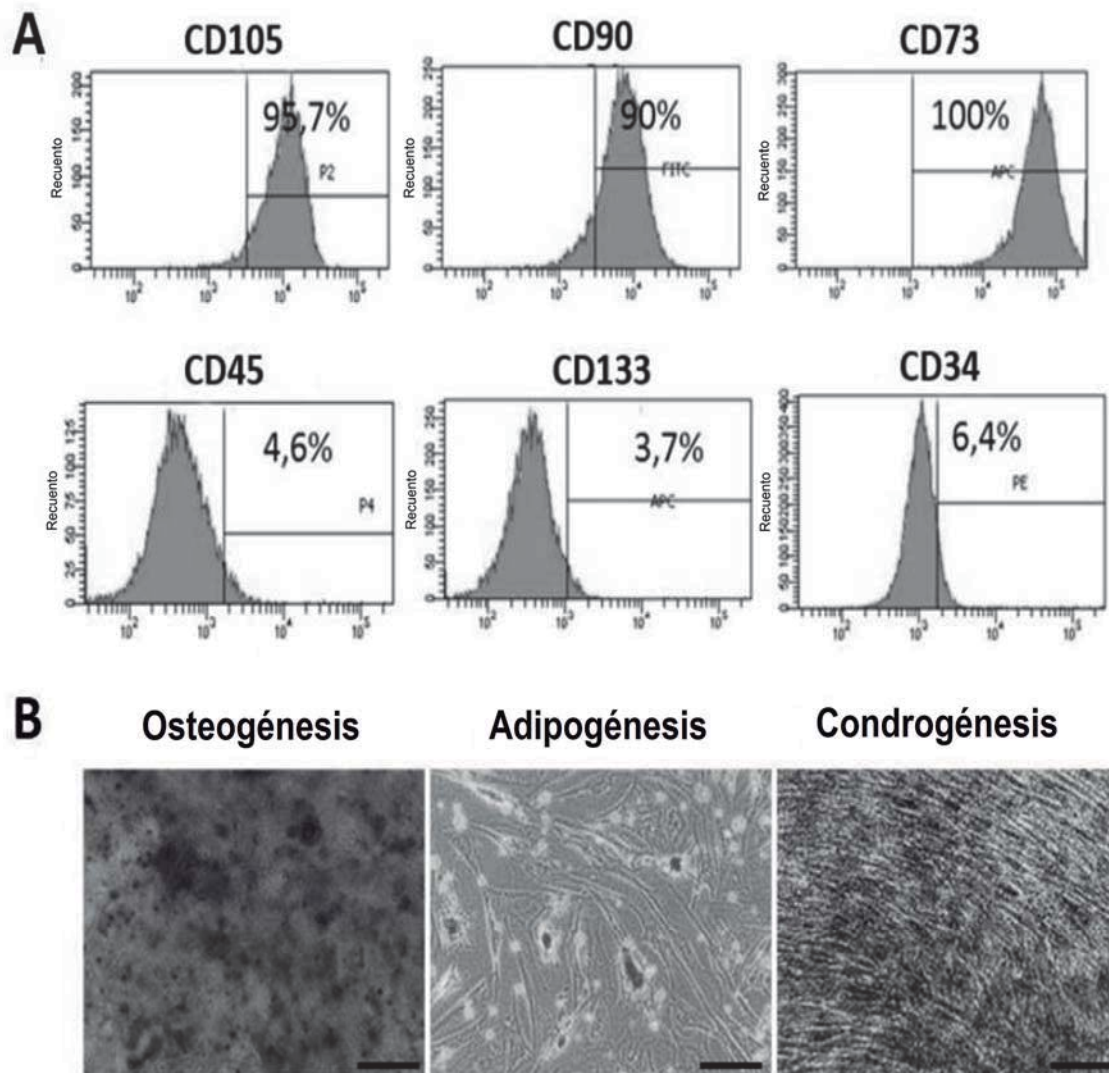


FIG. 1

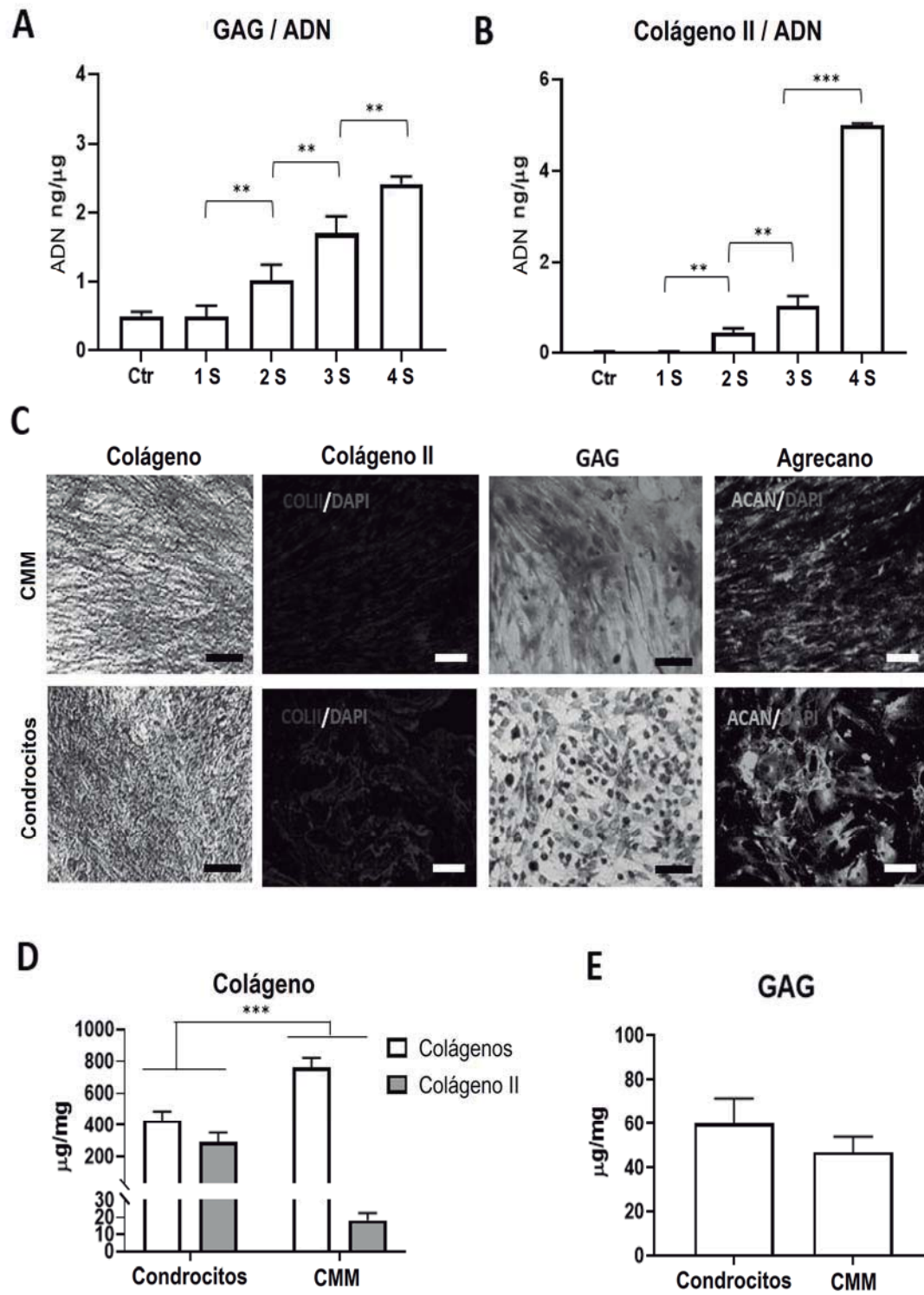


FIG. 2

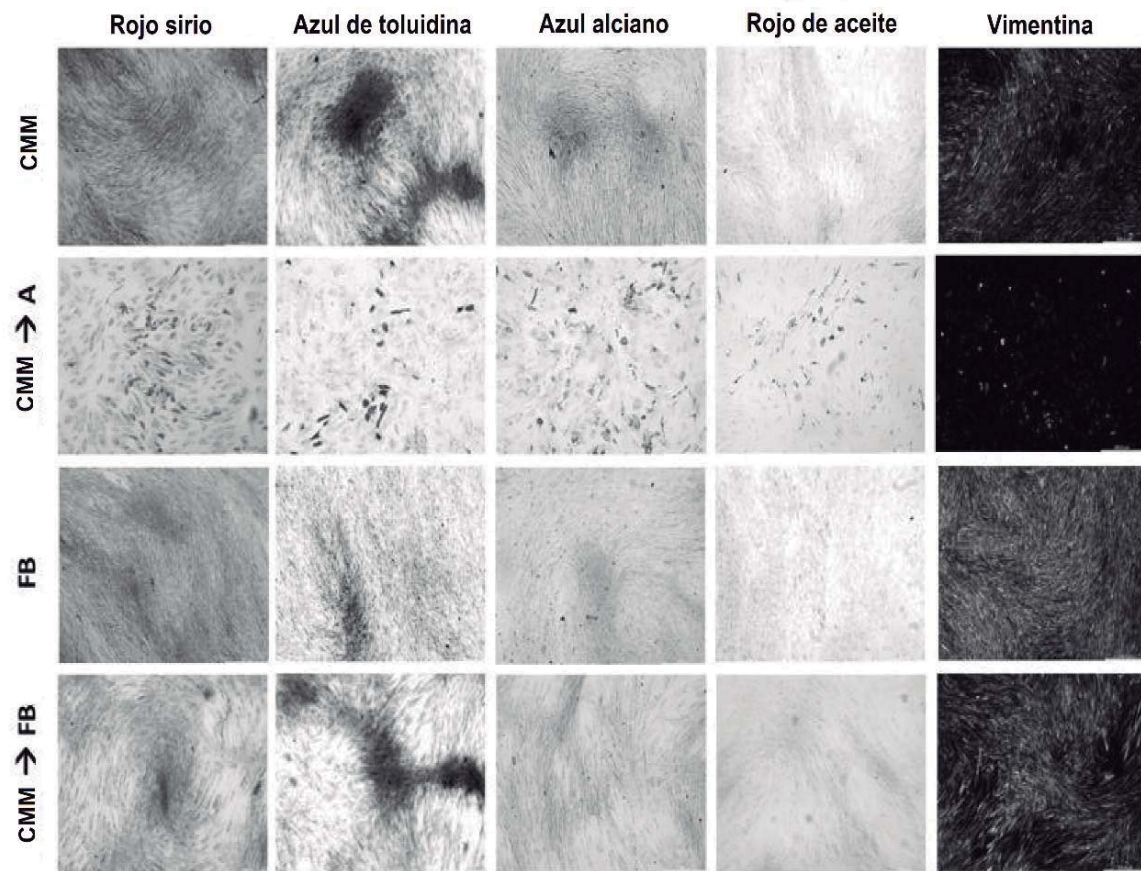


FIG. 3

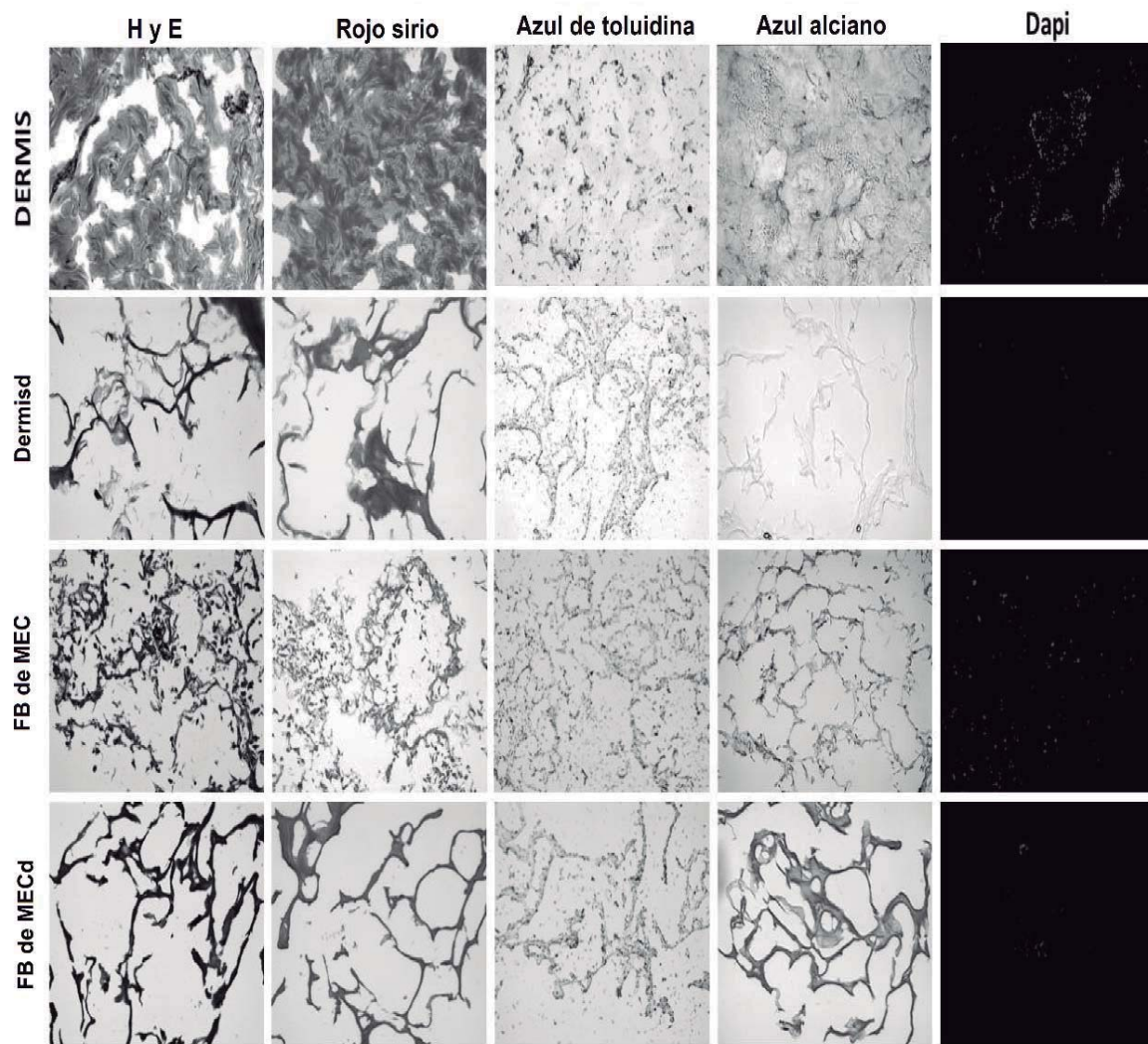


FIG. 4

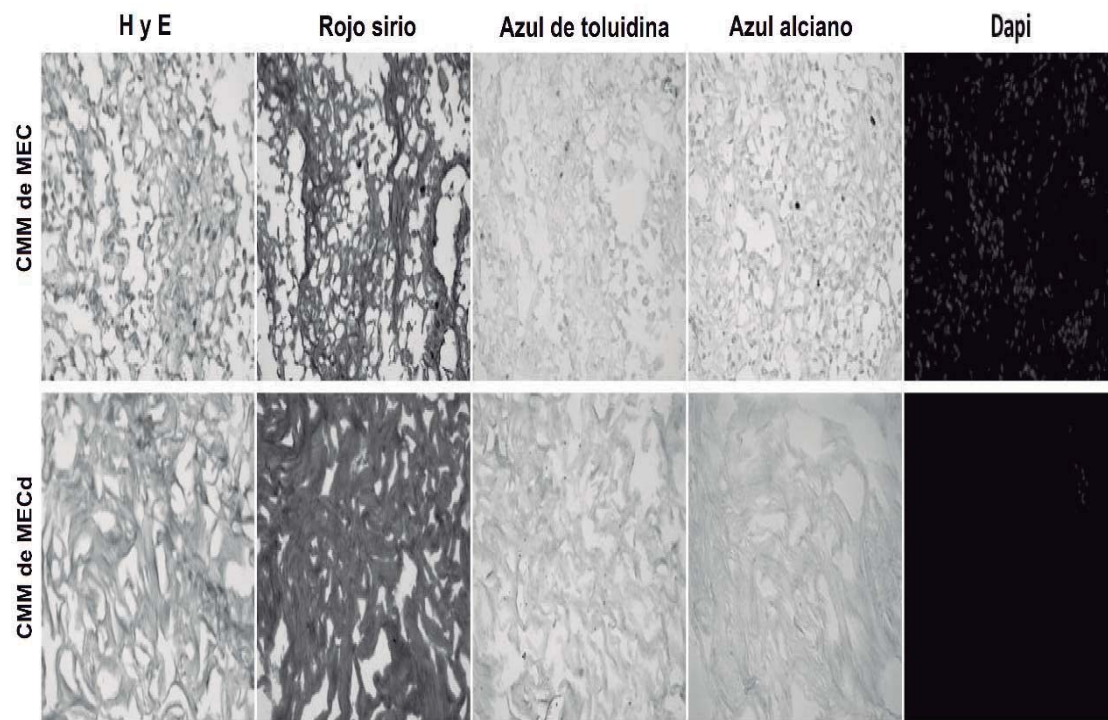
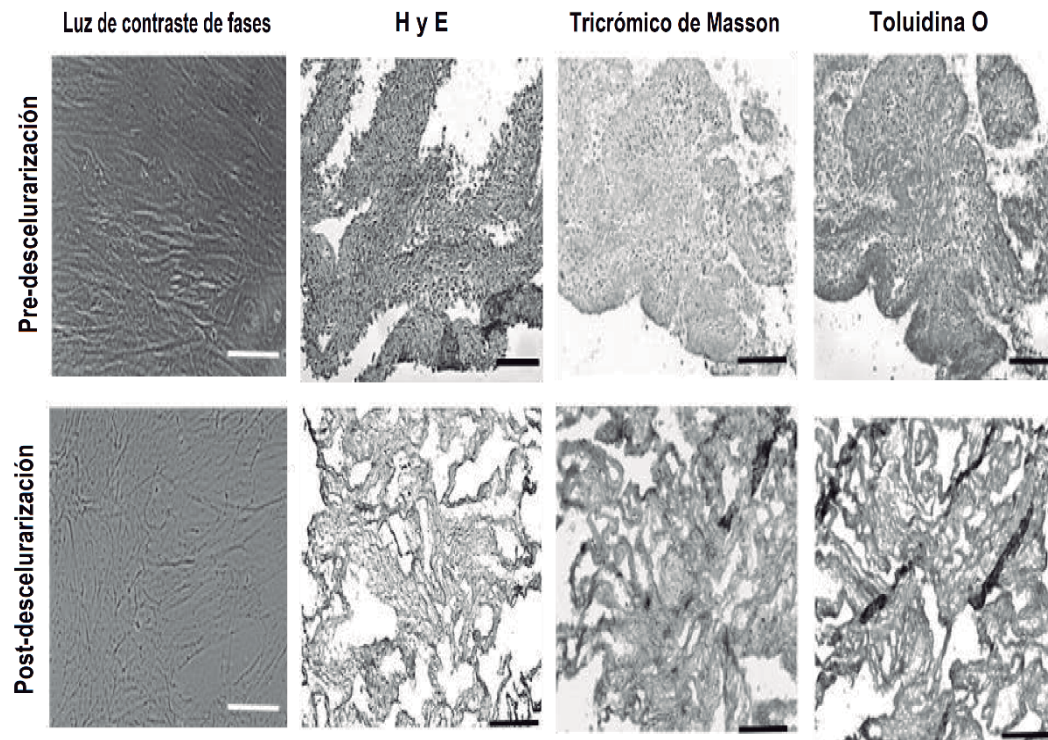
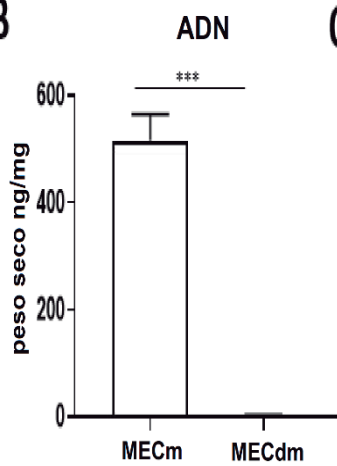


FIG. 5

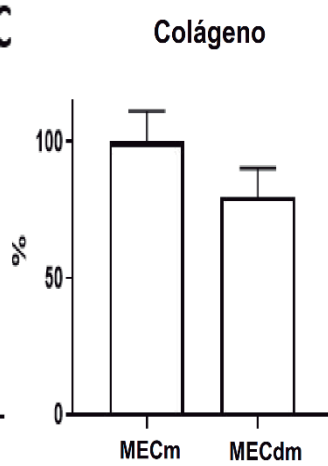
A



B



C



D

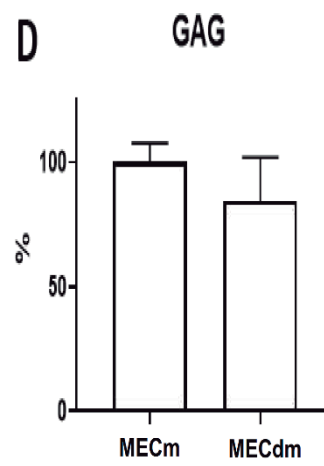


FIG. 6

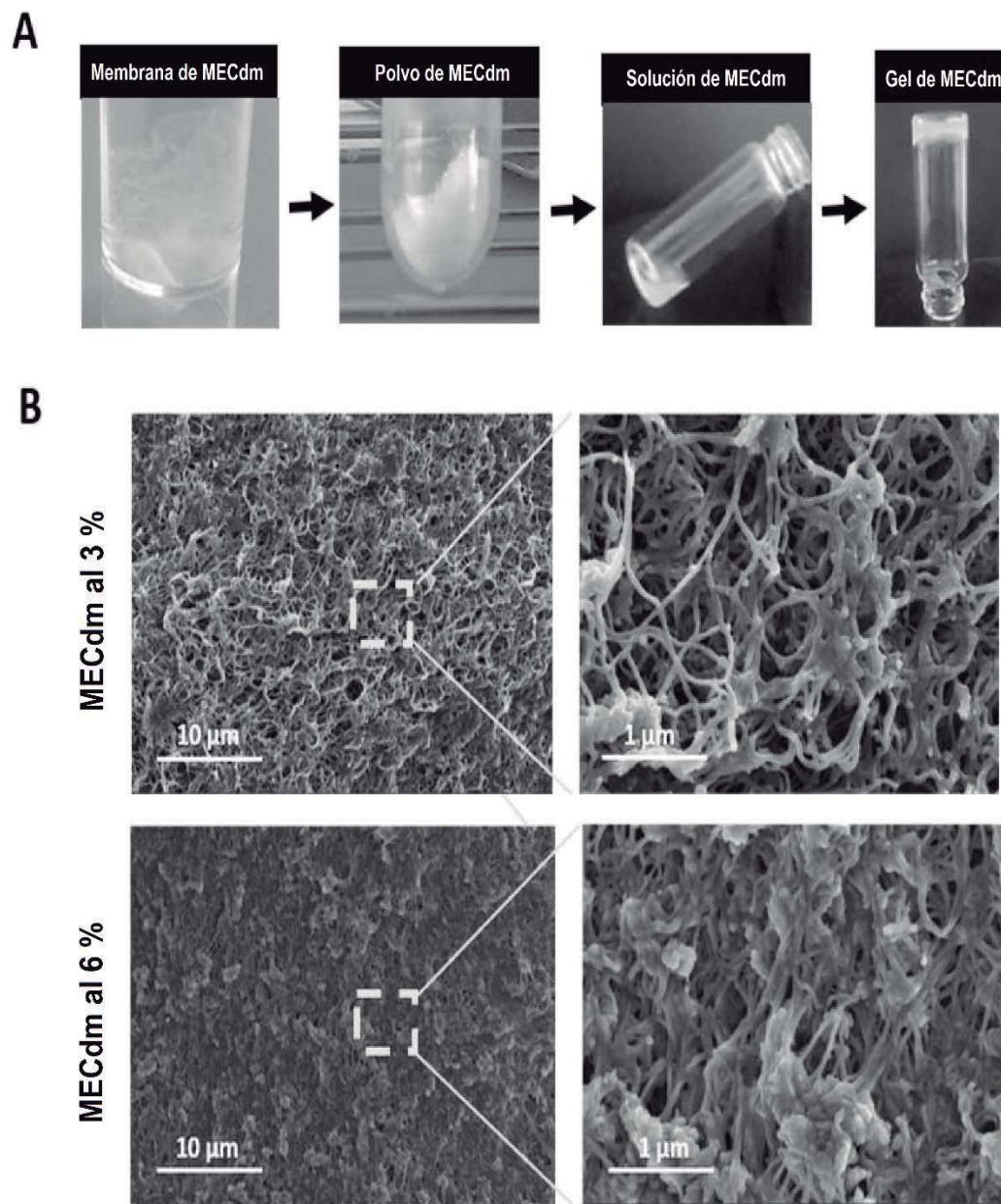


FIG. 7

C

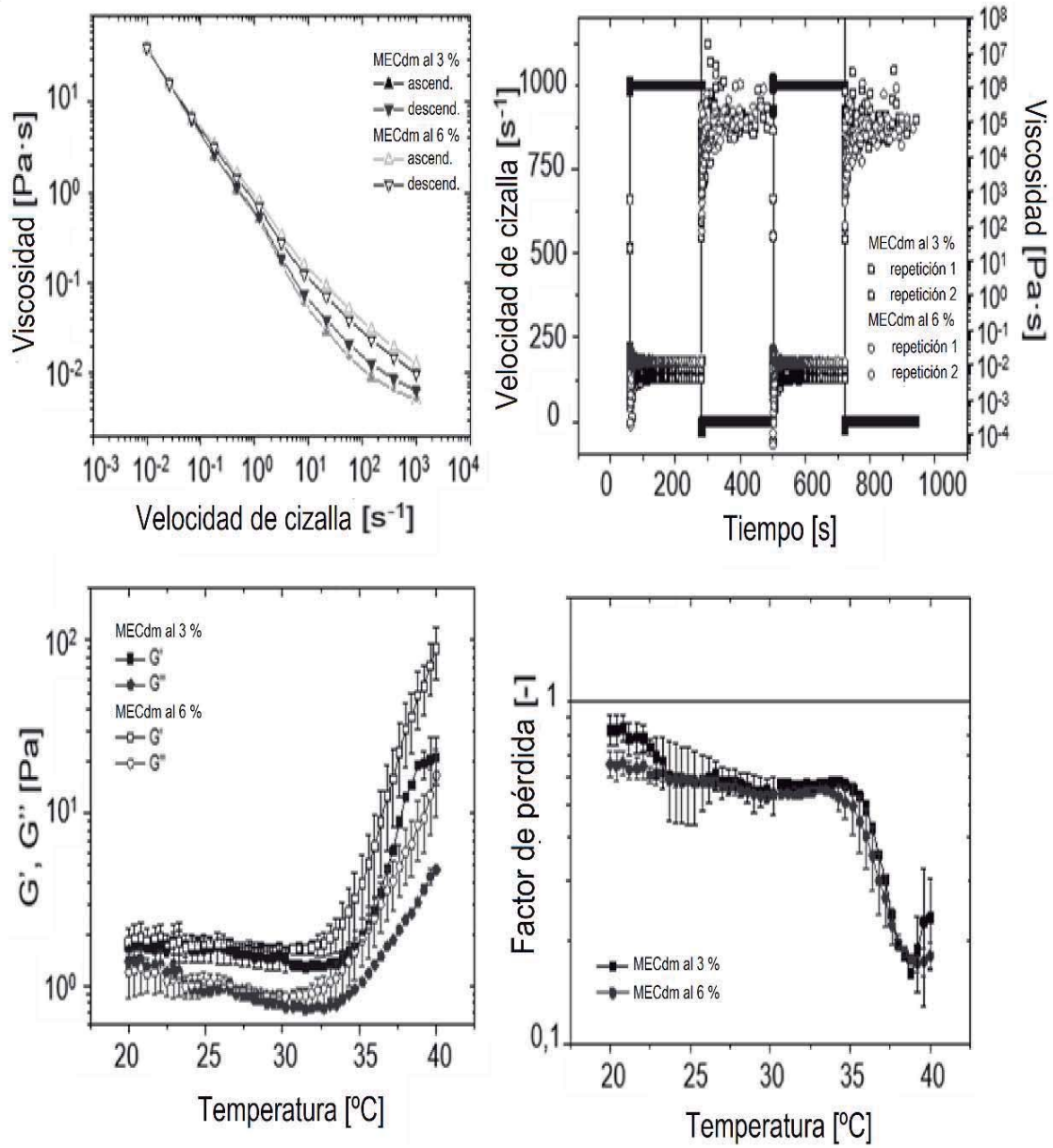


FIG. 7 (continuación)

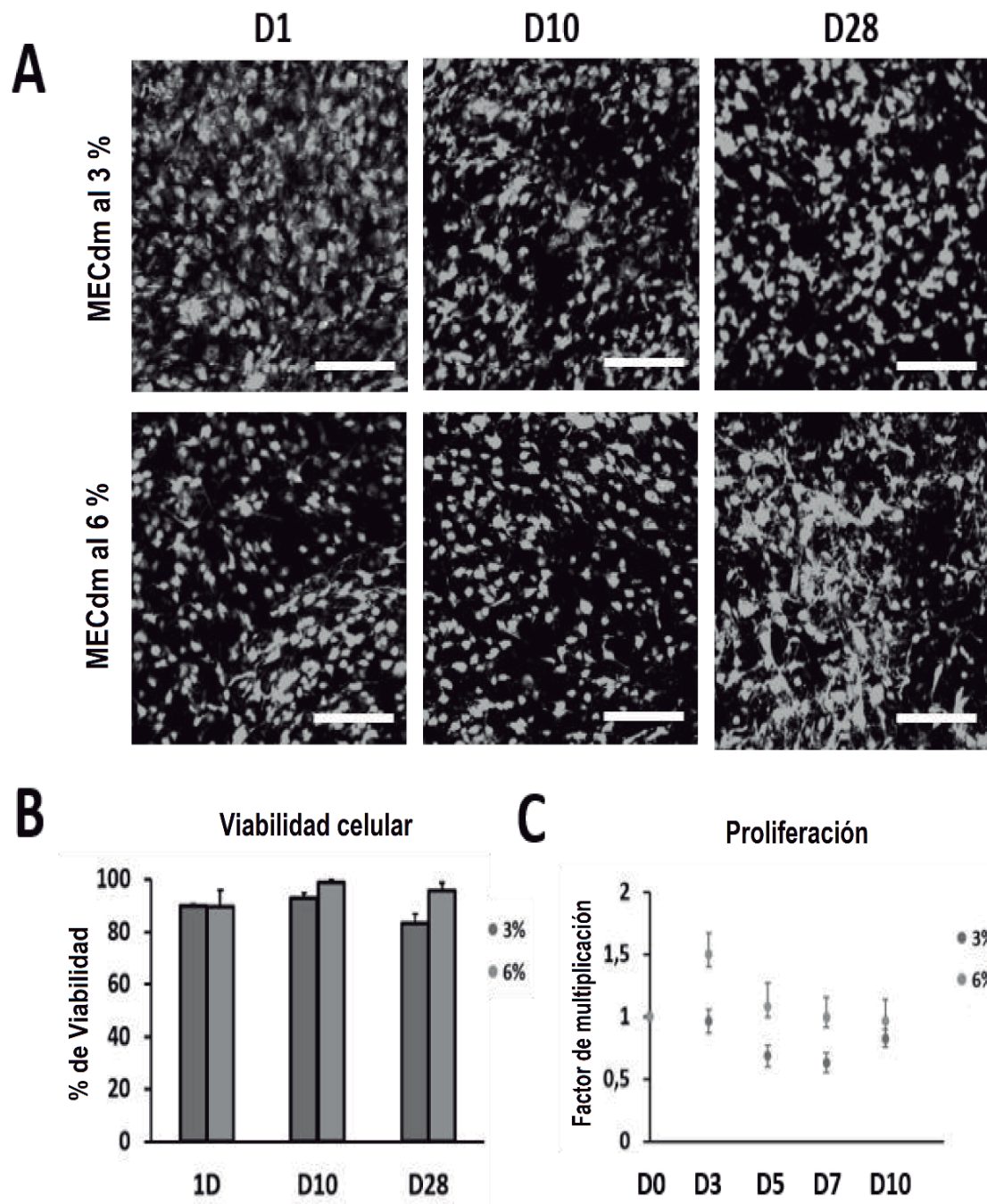
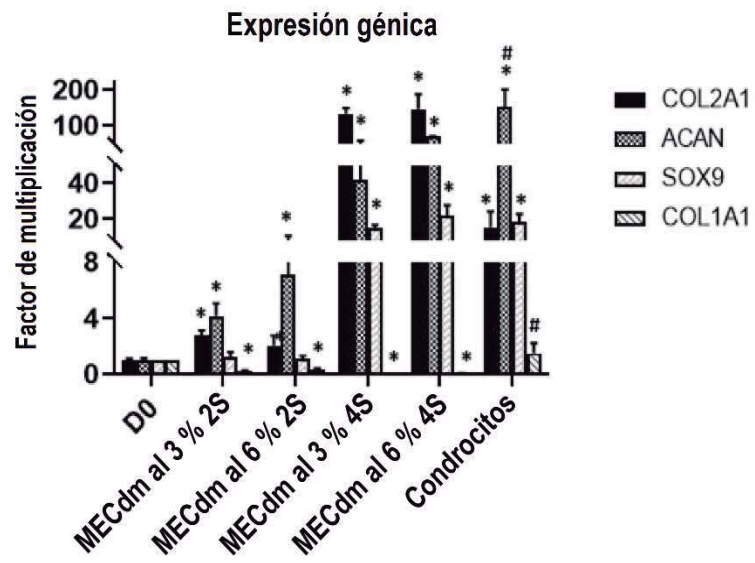


FIG. 8

D



E

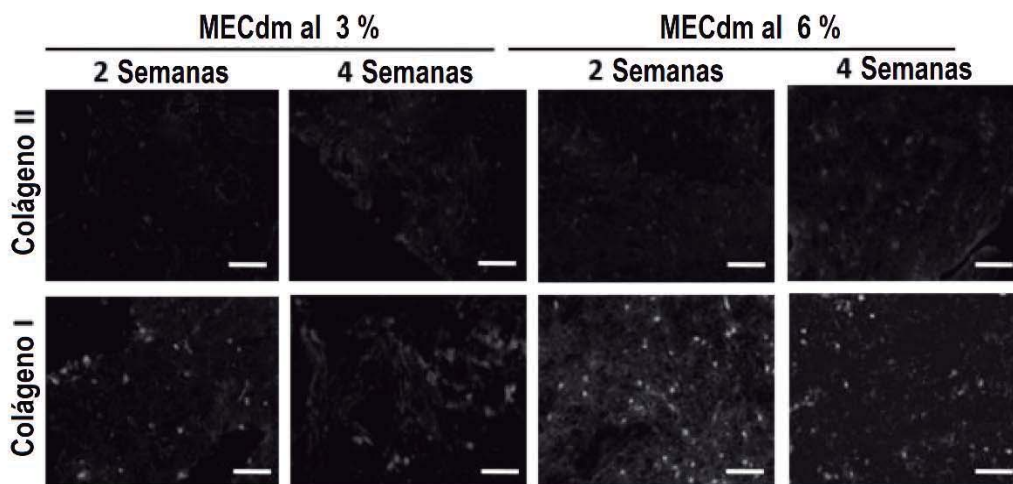


FIG. 8 (continuación)

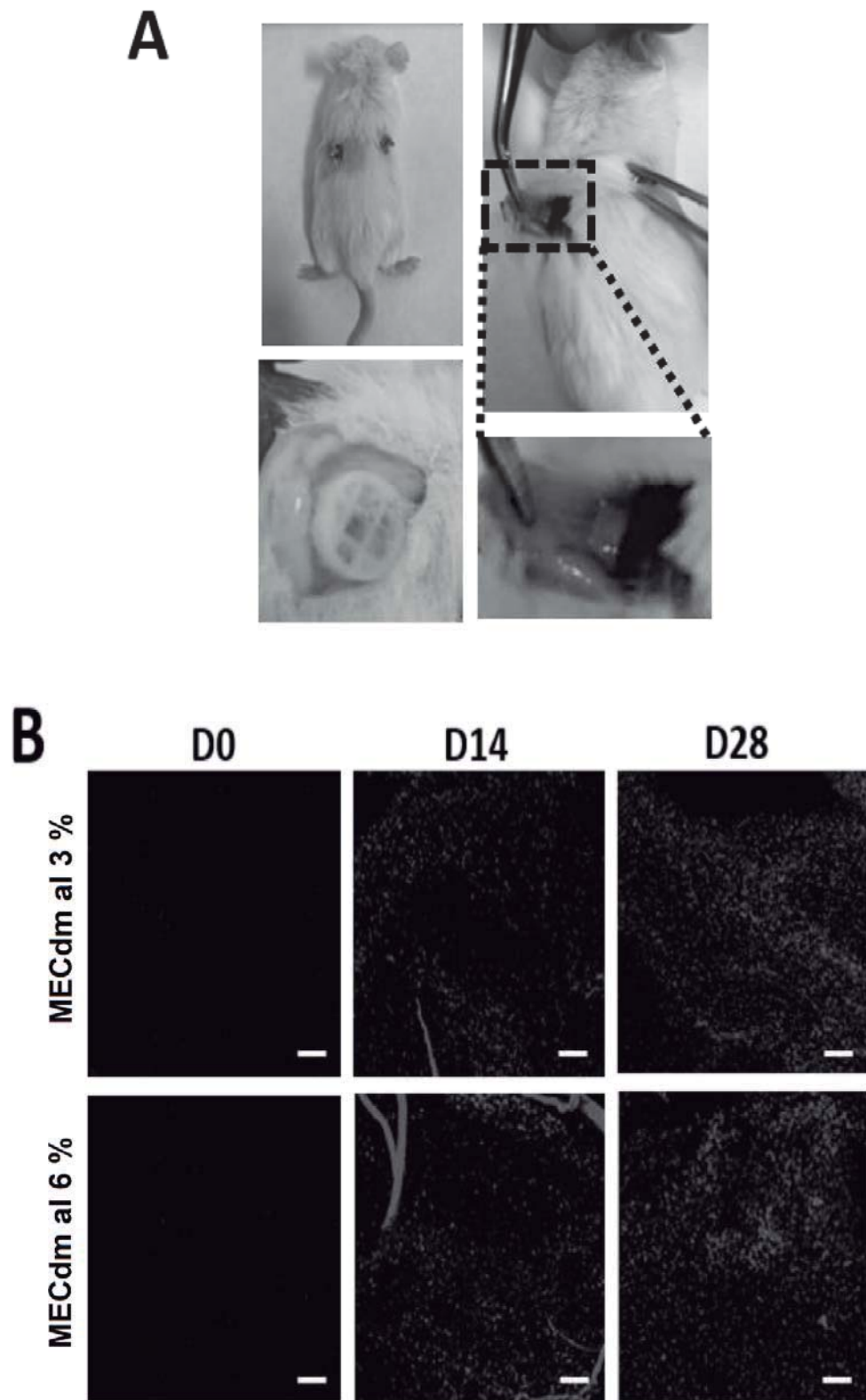


FIG. 9

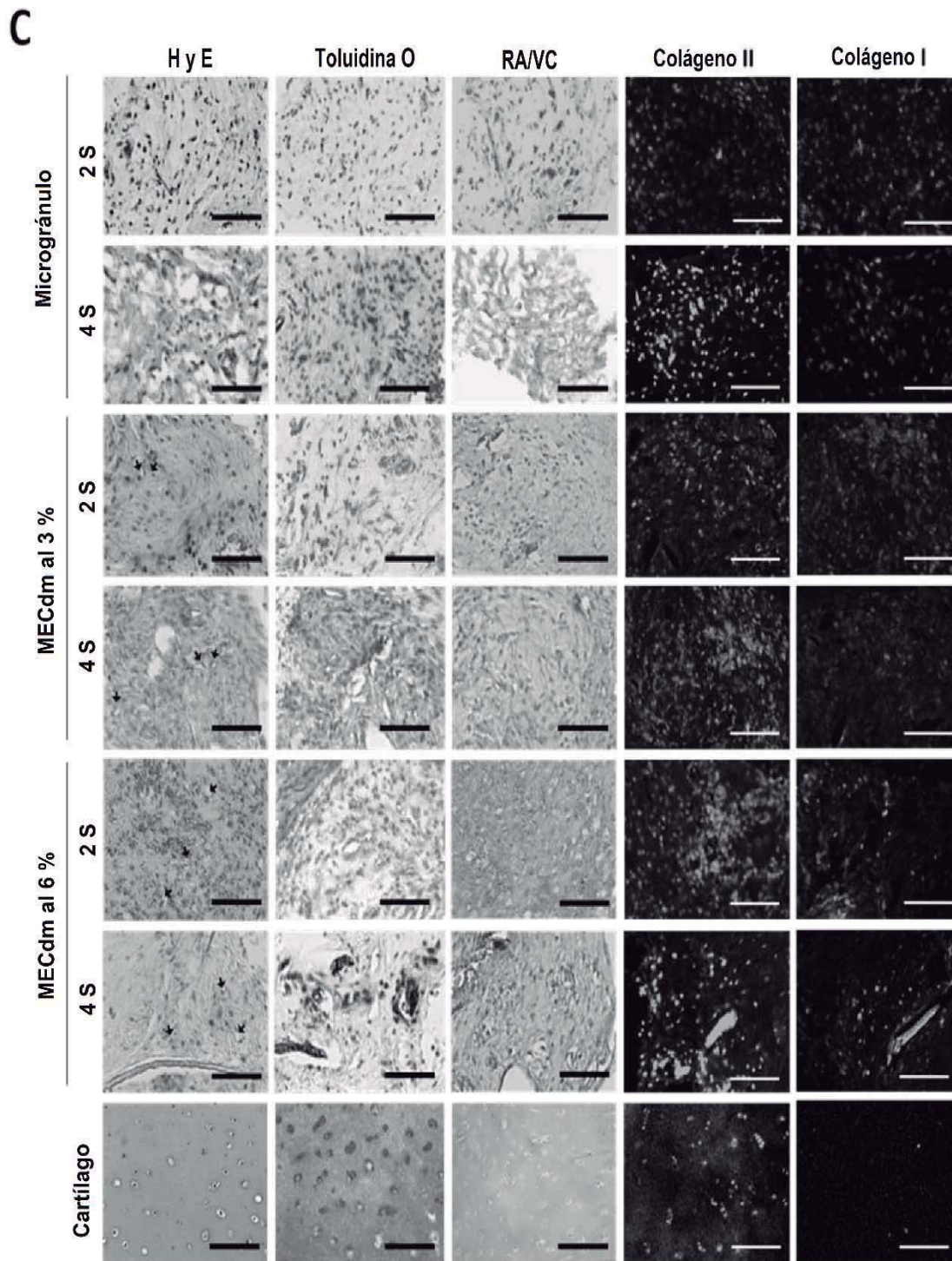


FIG. 9 (continuación)

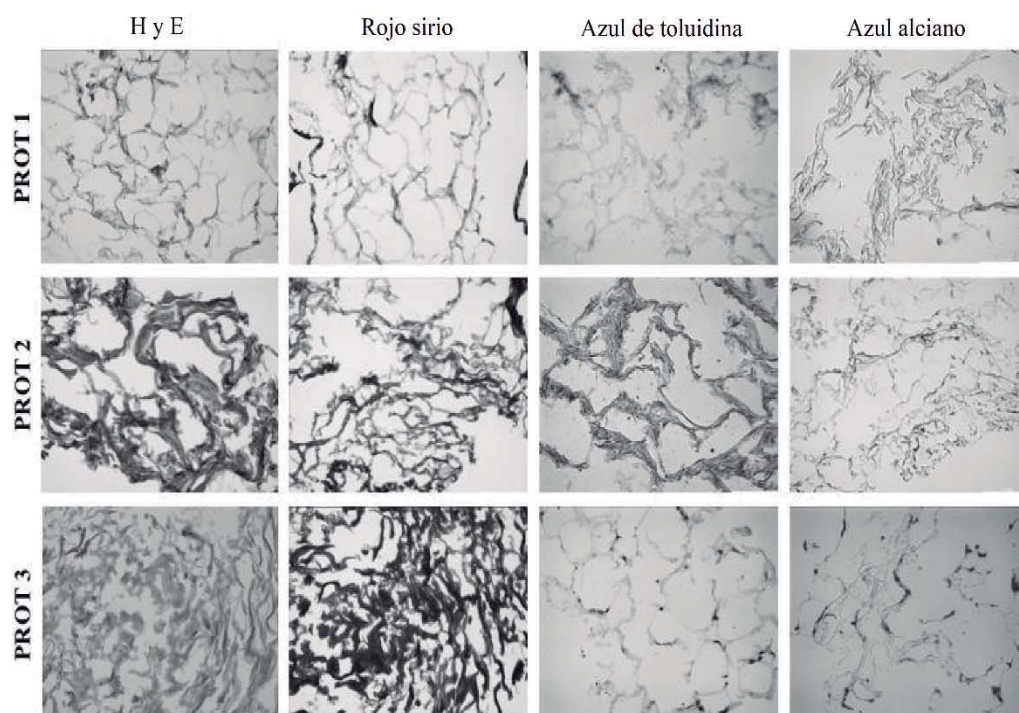


FIG. 10

Alg 2,5% -	Alg 2,5% -	Alg 2,5% -	Alg 2,5% -
Gel 10% -	GelMA 10%	Gel 10% -	GelMA 10%
HA 2,5%	- HA 2,5%	Fbn 1%	- Fbn 1%

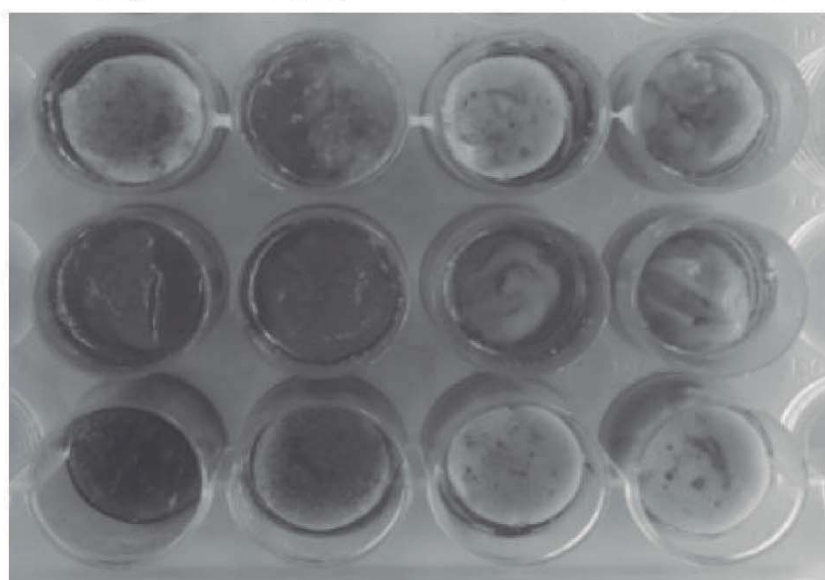


FIG. 11



②① N.º solicitud: 202130097

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.02.2021

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	XU Y <i>et al.</i> Preparation and characterization of bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix scaffolds. Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials 20150401 John Wiley and Sons Inc. usa, 01/04/2015, Vol. 103, Nº 3, Páginas 670 - 678, ISSN 1552-4973 (print) ISSN 1552-4981 (electronic), <DOI: doi:10.1002/jbm.b.33231>. página 671, columna izquierda, último párrafo- columna derecha, primer párrafo; página 671, columna izquierda, tercer párrafo; página 671, columna derecha, primer, segundo, tercer, cuarto y quinto párrafos; página 675, columna izquierda, segundo párrafo.	1-29
Y	YUANHENG YANG <i>et al.</i> Mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix enhances chondrogenic phenotype of and cartilage formation by encapsulated chondrocytes <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> . Acta Biomaterialia 15 March 2018 Elsevier B.V. Netherlands, 15/03/2018, Vol. 69, Páginas 71 - 82, ISSN 1742-7061 (print), <DOI: doi:10.1016/j.actbio.2017.12.043>. página 71; página 72, columna derecha, segundo párrafo; página 73, columna izquierda, penúltimo párrafo; página 73, columna derecha, segundo párrafo; página 74, columna derecha, cuarto párrafo; página 75, columna izquierda, primer párrafo; página 78, columna derecha, segundo párrafo; página 79, columna izquierda, último párrafo-columna derecha, primer párrafo; página 79, columna derecha, segundo párrafo; página 80, columna derecha, segundo párrafo.	1-28
A	ZHOU YAXIAN <i>et al.</i> Effects of Human Fibroblast-Derived Extracellular Matrix on Mesenchymal Stem Cells. Stem cell reviews and reports, 20160624 HUMANA PRESS Inc, US, 24/06/2016, Vol. 12, Nº 5, Páginas 560 - 572, ISSN 1550-8943, <DOI: doi:10.1007/s12015-016-9671-7>. resumen; página 561, columna izquierda, último párrafo-columna derecha, primer párrafo; página 561, columna derecha, segundo párrafo; página 561, columna derecha, último párrafo-página 562, columna izquierda, primer párrafo; página 563, columna derecha, primer párrafo, segundo y tercer párrafos; página 565, columna izquierda, segundo párrafo; página 565, columna derecha, segundo y tercer párrafos; página 567, columna derecha, primer párrafo; página 568, columna izquierda, último párrafo-columna derecha, primer párrafo; página 570, columna derecha, primer párrafo.	1-29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.12.2021

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/3



- ②① N.º solicitud: 202130097
②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.02.2021
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TANG C <i>et al.</i> An autologous bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix scaffold applied with bone marrow stimulation for cartilage repair. Tissue Engineering - Part A 20140901 Mary Ann Liebert Inc. usa. , 01/09/2014, Vol. 20, Nº 17-18, Páginas 2455 - 2462, ISSN 1937-3341 (print) ISSN 1937-335X (electronic), <DOI: doi:10.1089/ten.tea.2013.0464>. página 2456, columna izquierda, segundo párrafo; página 2456, columna derecha, tercer párrafo); página 2457, columna derecha, segundo párrafo y página 2459, columna derecha, segundo párrafo; página 2460, columna derecha, último párrafo- página 2461, columna izquierda, primer párrafo.	1-29
Y	ASHAMMAKHI N <i>et al.</i> Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs. Materials Today Bio, 01/01/2019, Vol. 1, Páginas 1-23, ISSN 2590-0064 (electronic), <DOI: doi:10.1016/j.mtbio.2019.100008>.página 12, columna derecha, tercer párrafo.	29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.12.2021

Examinador
S. González Peñalba

Página
2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L27/52 (2006.01)

A61L27/54 (2006.01)

A61K35/28 (2015.01)

A61F2/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61L, A61K, A61F

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP, INTERNET