

Método para la Obtención de Soportes de Cartílago Hialino Descelularizados a partir de Tráquea y Soportes de Cartílago Hialino de Tráquea Descelularizada

Sector tecnológico

Esta invención pertenece al campo de dispositivos médicos y tecnologías para tratamiento de lesiones condrales.

Estado de la Técnica

El cartílago es un tejido conjuntivo avascular de consistencia sólida, rodeado por un tejido conjuntivo denso llamado pericondrio. El cartílago articular es un tipo de cartílago hialino y su estructura es similar a la de los demás cartílagos hialinos, con la excepción de que carece de pericondrio (Ross & Pawlina 2007). Su principal función es permitir la movilidad de la articulación con un bajo coeficiente de fricción y facilitar la transmisión de cargas al hueso subyacente, lo cual lo hace único en su capacidad de soportar altas cargas cíclicas (Sophia Fox et al., 2009). La matriz del cartílago articular es sintetizada por los condrocitos y está constituida por colágeno, principalmente colágeno tipo II, proteoglicanos, glicoproteínas y agua (Dijkgraaf et al., 1995; Sophia Fox et al., 2009, Vinatier et al., 2009). Las lesiones en el cartílago articular son comunes debido a que este tejido se encuentra sometido a fuerzas de compresión y tensión mecánica durante las actividades de la vida diaria. Estas lesiones también pueden ser ocasionadas por accidentes, sobrepeso, defectos genéticos y envejecimiento, lo cual puede conducir a enfermedades degenerativas como la osteoartritis (Hardmeier et al., 2010). Debido a la limitada capacidad del cartílago para repararse así mismo, los defectos del cartílago requieren usualmente de intervenciones quirúrgicas. Los tratamientos convencionales de las lesiones condrales incluyen abrasión, perforación y microfractura del hueso subcondral, autoinjertos, aloinjertos y cuando estos tratamientos fallan se recurre a la artroplastia (Liao et al., 2014). En la mayoría de los casos, las técnicas de estimulación de la médula ósea resultan en la formación de tejido fibrocartilaginoso con propiedades mecánicas inferiores a las del cartílago hialino (Matsiko et al., 2013). Por su parte, los aloinjertos pueden producir

rechazos de tipo inmune y transmitir enfermedades infecciosas (Puppi et al., 2010); y aunque los autoinjertos no crean complicaciones de biocompatibilidad, el tejido disponible para injertar es escaso y extraer tejido sano del paciente crea un nuevo defecto en el sitio donante (Chiang & Jiang 2009). Entre los tratamientos de las lesiones del cartílago más innovadores, se encuentra la implantación de condrocitos autólogos (ACI). Sin embargo, entre sus desventajas se encuentran la necesidad de una doble intervención quirúrgica, morbilidad del sitio donante, un prolongado período de tiempo para expandir los condrocitos *in vitro* y la dediferenciación y pérdida celular después de la implantación; además, de hipertrofia del colgajo periostal (Matsiko et al., 2013; Haleem & Chu, 2010). Lo anterior, dio paso al desarrollo de soportes elaborados con diferentes materiales de origen natural y sintético, que buscan regenerar el cartílago lesionado al proporcionar un ambiente que estimule la adhesión, proliferación y diferenciación de condrocitos o células madre mesenquimales, endógenas o exógenas a la lesión (Madeira et al., 2015). La familia de proteínas del colágeno, es la más abundante en la matriz extracelular (MEC) de los tejidos de sostén. Su popularidad como biomaterial es atribuida a su conservación entre especies; así como, a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja inmunogenicidad y capacidad para promover la adhesión, diferenciación y proliferación celular, todas características necesarias para restaurar la estructura y función de los tejidos (Parenteau- Bareil et al., 2010). El colágeno II es el principal componente del cartílago articular y es de interés particular como material para ingeniería de tejido cartilaginoso (Matsiko et al., 2013). Diversos estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de los soportes de colágeno tipo II de mantener el fenotipo diferenciado de los condrocitos, de sintetizar matriz extracelular del cartílago hialino y de inducir diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales (Nehrer et al., 1997; Pieper et al., 2002; Gigante et al., 2003; Bosnakovski et al., 2006; Lu et al., 2010). El ácido hialurónico, un componente de la matriz extracelular del cartílago articular, ha sido ampliamente usado en la elaboración de soportes para ingeniería de tejido cartilaginoso (Aigner et al., 1998; Grigolo et al., 2001; Grigolo et al., 2002; Nehrer et al., 2008; Eshed et al., 2012). Productos comercialmente disponibles como Hyalograft-C han demostrado su capacidad de restaurar lesiones condrales, con características similares a las del cartílago nativo (Gobbi et al., 2006). Sin embargo, se ha reportado que los productos de degradación de los soportes elaborados con este biomaterial pueden ser citotóxicos (Knudson et al., 2000). *In vitro*, hidrogeles de alginato-agarosa han inducido diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Awad et al., 2004). Como sistema de entrega de condrocitos, estos hidrogeles han demostrado respuestas clínicas satisfactorias en lesiones grandes y profundas (Selmi et al., 2008). Aún así, como biomaterial poseen propiedades mecánicas limitadas y por su naturaleza heteropolisacárida son inmunógenos y poco biocompatibles (Chiang & Jiang; 2009). Aunque la fibrina ha sido un material de interés para regeneración de cartílago, los soportes elaborados con este biomaterial no proporcionan las propiedades

mecánicas requeridas por las células para mantener su función (Van Susante et al; 1999) y desencadenan respuestas inflamatorias (kawabe & Yoshinao; 1991). Por lo anterior, este material ha sido empleado principalmente para fijar otros biomateriales en el lecho de la lesión (Pavesio et al., 2003). Entre los materiales de origen sintético más empleados están el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PLGA) y copolímeros de los mismos (PLA/PLGA). Sin embargo, sus productos de degradación pueden causar inflamación y muerte celular (Matsiko et al; 2013, Nesic et al 2006). Adicionalmente, estas matrices sintéticas no poseen sitios de unión que faciliten la adhesión celular (Haleem & Chu; 2010).

Otra fuente de origen natural empleada para reemplazar tejido cartilaginoso es la matriz extracelular (MEC), derivada de tejidos descelularizados. El objetivo del proceso de descelularización es eliminar de manera eficiente el material celular preservando las características del tejido nativo. De este modo, se evita la activación de la respuesta inmune y se preservan características estructurales que modulan la migración, proliferación y diferenciación celular (Fu et al., 2014). Los soportes obtenidos mediante descelularización de tejido cartilaginoso emplean técnicas de pulverización (Yang et al., 2008; Moradi et al., 2014; Yang et al., 2010; Kang et al., 2012), lo cual altera las características estructurales del tejido. Por otra parte, el tejido empleado para obtener estos soportes generalmente es cartílago articular humano (Lehmann et al., 2016) cartílago articular porcino (Schwarz et al., 2012; Cheng et al., 2009) oreja de cerdo (Gong et al., 2011), septo nasal (Schwarz et al., 2012) y menisco porcino (Chen et al., 2015). El rendimiento obtenido al emplear estos tejidos es bajo debido a su tamaño, lo cual puede impactar los costos del proceso de producción a gran escala de los soportes descelularizados. Una ventaja adicional de la metodología que aquí se presenta tiene que ver con que otros métodos descritos requieren de ciclos repetitivos para obtener niveles de DNA aceptables (Kheir et al., 2012). Nuestro proceso permite obtener soportes de cartílago hialino descelularizado en un corto período de tiempo, haciendo uso de reactivos comunes del laboratorio y sin modificar significativamente las características del tejido nativo; además, la tráquea no ha sido empleada como fuente de obtención de soportes para regeneración de cartílago articular (Benders et al., 2013). El tamaño de los tejidos bovinos, en particular la tráquea, permite obtener una mayor cantidad de tejido por individuo, lo cual representa un aumento en el rendimiento.

Descripción de las figuras

Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de los soportes. Secciones longitudinales (A) y secciones transversales (B) de los soportes de cartílago hialino descelularizado.

Figura 2. Evaluación histológica e inmunohistoquímica. Cartílago hialino nativo y cartílago hialino descelularizado teñidos con hematoxilina & eosina (H&E), azul de alcian, picosirius

red e inmunoteñidos con anticuerpo monoclonal anti- α -gal.

Figura 3. Contenido de ADN (A), colágeno (B) y glicosaminoglicanos (GAGs) en el cartílago nativo y en el cartílago descelularizado. (n = 4). * $p < 0.05$.

Figura 4. Biodegradabilidad. Cinética de degradación de los soportes de cartílago hialino descelularizado en función del tiempo. (n = 4).

Figura 5. Ensayos mecánicos. Módulo de Young (A) y módulo de compresión (B) de los soportes de cartílago hialino descelularizado. (n = 3).

Figura 6. Análisis histológico. Tinciones con hematoxilina & eosina (H&E) y safranina O de los soportes de cartílago hialino descelularizado sembrados con células madre mesenquimales humanas de médula ósea (hBMSC) o células madre mesenquimales humanas de tejido adiposo (hASC) y cultivados con medio de diferenciación condrogénico durante 28 días. El recuadro en la esquina superior izquierda muestra el tamaño de los soportes.

Figura 7. Análisis inmunohistoquímico. Inmunotinción con agrecano y colágeno II de los soportes de cartílago hialino descelularizado sembrados con células madre mesenquimales humanas de médula ósea (hBMSC) o células madre mesenquimales humanas de tejido adiposo (hASC) y cultivados con medio de diferenciación condrogénico durante 28 días.

Descripción de la invención

Combinando y modificando métodos ya publicados, se estableció un procedimiento para descelularizar cartílago hialino. Las modificaciones introducidas permitieron desarrollar una nueva metodología con la que se pudieron obtener soportes de cartílago hialino descelularizados de tejido traqueal y libres del epítotope alfa-gal, principal inmunógeno de los xenoinjetos. Por otra parte, la tráquea no ha sido empleada para obtener soportes de cartílago hialino descelularizado con miras a ser empleada en tratamiento de lesiones condrales. El tejido cartilaginoso proveniente de la tráquea bovina, rica en colágeno II y glicosaminoglicanos, después de ser descelularizado permite la adhesión, proliferación y diferenciación de células madre derivadas de médula ósea (hBMSCs) y células madre derivadas de tejido adiposo (hASCs) humanas.

Para iniciar el procedimiento, los tejidos adyacentes a los anillos cartilaginosos son removidos con ayuda de una herramienta corto-punzante. Luego, láminas de cartílago hialino son obtenidas mediante cortes con micrótopo. Estas láminas deben tener un grosor entre 100 μ m y 500 μ m y diámetros que van desde 3mm a 10mm de diámetro. Con el fin de

lizar las células, estas láminas son sometidas a tratamiento osmótico durante 15 a 25 horas con agua destilada o agua desionizada. Posteriormente, son tratadas con una solución alcalina con una concentración entre 0,05 M y 2 M (pH de 12 a 13) durante 30 minutos a 3 horas y a una temperatura entre 0°C y 40°C para denaturar y remover ADN y ARN. La solución alcalina debe ser seleccionada de NaOH, KOH, Ca(OH)₂, CaO, Mg(OH)₂ or LiOH. Después del tratamiento alcalino, las muestras son lavadas varias veces con agua destilada o agua desionizada. Después de los lavados, las muestras son digeridas enzimáticamente. La enzima debe ser tripsina o dispasa, empleada en concentraciones entre 0,1% y 0,5% en un tampón fosfato salino PBS durante 2 a 4 horas, entre 32°C y 37°C. Después del tratamiento enzimático, las muestras son lavadas varias veces con agua destilada o agua desionizada. Con el fin de eliminar componentes lipofílicos, el tejido es tratado con detergente. Este detergente puede ser Triton X-100 o SDS con una concentración entre el 1% y 5% durante 20 minutos a 48 horas y a una temperatura entre 0°C y 40°C. Después del tratamiento con el detergente, las muestras son lavadas varias veces con agua destilada o agua desionizada. Nuevamente, las muestras son tratadas con una solución alcalina con una concentración entre 0,05M y 2M (pH de 12 a 13) durante 30 minutos a 3 horas y a una temperatura entre 0°C y 40°C. Finalmente, para obtener los soportes de cartílago hialino descelularizado, las muestras sometidas al proceso de descelularización son congeladas y liofilizadas entre 24 horas a 48 horas.

Ejemplos

Ejemplo 1. Procesamiento del tejido

Los tejidos adyacentes a los anillos de tráquea bovina son eliminados con un bisturí. Los anillos traqueales son lavados cada 30 minutos durante 4 horas en PBS y luego dejados en nuevo PBS durante toda la noche. El cartílago limpio es cortado en láminas de 300µm de grosor con un micrótopo y de 5mm de diámetro con un punch de biopsia.

Ejemplo 2. Tratamiento osmótico

Las muestras obtenidas del paso anterior son tratadas con agua destilada durante 24 horas a temperatura ambiente y con agitación constante. Durante las primeras 4 horas el agua es cambiada cada 30 minutos.

Ejemplo 3. Tratamiento alcalino

Después de las 24 horas, las muestras son transferidas a una solución de NaOH 1M (pH 13) durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Después de 3 horas, los tejidos son lavados durante 24 horas con agua destilada. Durante las primeras 4 horas,

el agua es reemplazada por agua nueva cada 30 minutos y el pH es registrado. Si el pH no ha bajado después de 24 horas, los lavados continúan.

Ejemplo 4. Tratamiento enzimático

Luego de los lavados sucesivos del paso anterior, los tejidos fueron tratados con tripsina-EDTA 0,25%-0,02% en un tampón fosfato salino PBS pH 7,4 a 37°C durante 4 horas en agitación constante. Posteriormente, los tejidos son lavados durante 24 horas con agua destilada. Durante las primeras 4 horas, el agua es reemplazada por agua nueva cada 30 minutos.

Ejemplo 5. Tratamiento con detergente

Los tejidos son tratados con el detergente Triton X-100 al 1% durante 24 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. Luego los tejidos son lavados durante 24 horas con agua destilada. Durante las primeras 4 horas, cada 30 minutos el agua es reemplazada por agua nueva.

Ejemplo 6. Tratamiento alcalino adicional

Nuevamente, las muestras son transferidas a una solución de NaOH 1M (pH 13) durante 3 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. Después de 3 horas, los tejidos son lavados durante 24 horas con agua destilada. Durante las primeras 4 horas, cada 30 minutos el agua es reemplazada por agua nueva y el pH es registrado. Si el pH no ha bajado después de 24 horas, los lavados continúan.

Ejemplo 7. Obtención de los soportes de cartílago hialino descelularizados.

Los tejidos de 300 µm de grosor y 5 mm de diámetro sometidos al proceso de descelularización descrito en esta solicitud, son congelados a -20°C por 24 horas y liofilizados durante 48 horas. La microestructura de los soportes se presenta en la **Figura 1**.

Ejemplo 8. Imágenes histológicas e inmunohistoquímicas como evidencia de la efectividad del proceso de descelularización.

Las muestras de tejido descelularizado se fijaron con formaldehído al 10 % en PBS (pH 7.4, 4 °C, 24 h), se lavaron con PBS, se incluyeron en parafina y se seccionaron con un micrótopo. Los condrocitos y GAGs se evaluaron mediante tinción con hematoxilina & eosina (H&E) y azul alcian, respectivamente. La tinción picosirius red se empleó para evaluar la presencia y orientación de las fibras de colágeno. Para la detección inmunohistoquímica del epítipo a-gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R). En estos análisis se

incluyó cartílago nativo como control negativo de la descelularización (**Figura 2**).

Ejemplo 9. Análisis bioquímico como evidencia de la efectividad del proceso de descelularización.

El contenido de ADN, colágeno y GAGs de los tejidos descelularizados constituye un parámetro importante en la evaluación de la calidad del proceso de descelularización. Por lo tanto, los soportes de cartílago hialino descelularizado fueron analizados con el fin de cuantificar el ADN, el colágeno y los GAGs remanentes. En estos análisis se incluyó cartílago nativo como control negativo de la descelularización (**Figura 3**).

Ejemplo 10. Evaluación de la degradación enzimática de los soportes de cartílago hialino descelularizado

La biodegradabilidad de los soportes fue evaluada mediante digestión enzimática con colagenasa II a las 2, 4, 6 y 8 horas. La degradación enzimática fue determinada a partir del peso residual de los soportes y expresada como un porcentaje de su peso inicial (**Figura 4**).

Ejemplo 11. Evaluación del módulo de Young y el módulo de compresión de cartílago hialino descelularizado

El módulo de Young se calculó en función de la pendiente de la curva tensión-deformación y se presenta como el promedio de los valores obtenidos de tres réplicas. El módulo de compresión se calculó como la pendiente de la región lineal de la curva tensión-deformación que estuvo en el rango del 5% al 10% de deformación y se presenta como el promedio de los valores obtenidos de tres réplicas (**Figura 5**).

Ejemplo 12. Evaluación histológica e inmunohistoquímica de los soportes de cartílago hialino descelularizado, sembrados con células madre mesenquimales.

Para todos los análisis, se sembraron soportes estériles (19,6 mm²) de cartílago hialino descelularizado con células madre mesenquimales (1.5×10^5 células/20µL de medio) y se incubaron (37 °C, 5%, CO₂) en medio de diferenciación condrogénico durante 28 días, cambiando de medio cada dos días. Para el análisis histológico las muestras se lavaron con PBS, se fijaron con formaldehído al 10% en PBS (pH 7.4), se incubaron (4 °C, 24 h), se incluyeron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con H&E o safranina-O. Para la inmunotinción, las muestras se incluyeron en parafina de bajo punto de fusión y se seccionaron. Luego, las muestras se incubaron con anticuerpos primarios anti-colágeno II

y anti-agrecano y posteriormente con el anticuerpo secundario diluido en la solución de bloqueo (Figuras 6 y 7).

Bibliografía

1. Aigner J, Tegeler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C, Kastenbauer E, Naumann A. (1998). Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Nanotechnol*, 42(2):172-81.
2. Awad, H. A., Wickham, M. Q., Leddy, H. A., Gimble, J. M., & Guilak, F. (2004). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 25(16), 3211–22. [L]
[SEP]
3. Benders, K.E.M., Weeren, P. R., Badylak, S.F., Saris, B.F., Dhert, J.A and Malda, J. (2013). Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. *Trends in Biotechnology*, Vol. 31, No. 3.
4. Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G., Takagi, S., Okumura, M., Fujinaga, T. (2005). Chondrogenic Differentiation of Bovine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Different Hydrogels: Influence of Collagen Type II Extracellular Matrix on MSC Chondrogenesis. *Biotechnol Bioeng*. 93(6):1152-63. [L]
[SEP]
5. Chen YC, Chen RN, Jhan HJ, Liu DZ, Ho HO, Mao Y, Kohn J, Sheu MT. (2015). Development and Characterization of Acellular Extracellular Matrix Scaffolds from Porcine Menisci for Use in Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*, 21(9):971-86.
6. Cheng NC, Estes BT, Awad HA, Guilak F. (2009). Chondrogenic differentiation of adipose- derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. *Tissue Eng Part A*, 15(2):231-241. [L]
[SEP]
7. Cheng, N.C., Estes, B. T., Awad, H. A., & Guilak, F. (2009). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. *Tissue Engineering. Part A*, 15(2), 231–41.
8. Chiang H, Jiang CC. (2009). Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *J Formos Med Assoc*, 108(2):87-101. [L]
[SEP]
9. Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS. (1995). "Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature." *J Oral Maxillofac Surg*, 53(8):924-929.
10. Eshed, I., Trattnig, S., Sharon, M., Arbel, R., Nierenberg, G., Konen, E., & Yayon, A. (2012). Assessment of cartilage repair after chondrocyte transplantation with a

- fibrin-hyaluronan matrix--correlation of morphological MRI, biochemical T2 mapping and clinical outcome. *European Journal of Radiology*, 81(6), 1216–23. [L][SEP]
11. Fu RH, Wang YC, Liu SP, Shih TR, Lin HL, Chen YM, Sung JH, Lu CH, Wei JR, Wang ZW, Huang SJ, Tsai CH, Shyu WC, Lin SZ. (2014). Decellularization and [L][SEP]recellularization technologies in tissue engineering. *Cell Transplant*, 23(4-5):621–[L][SEP]
 12. Gigante A, Bevilacqua C, Cappella M, Manzotti S, Greco F. (2003). Engineered [L][SEP]articular cartilage: influence of the scaffold on cell phenotype and proliferation. [L][SEP]*Journal Of Materials Science: Materials In Medicine*, 14:713-716. [L][T][SEP]
 13. Gobbi, A., Kon, E., Berruto, M., Francisco, R., Filardo, G., & Marcacci, M. (2006). [L][SEP]Patellofemoral full-thickness chondral defects treated with Hyalograft-C: a clinical, arthroscopic, and histologic review. *The American Journal of Sports Medicine*, 34(11), 1763–73. [L][SEP]
 14. Gong YY, Xue JX, Zhang WJ, Zhou GD, Liu W, Cao Y. (2011). A sandwich model for engineering cartilage with acellular cartilage sheets and chondrocytes. *Biomaterials*, 32(9):2265-73.
 15. Grigolo, B., Lisignoli, G., Piacentini, A., Fiorini, M., Gobbi, P., Mazzotti, G., Facchini, A. (2002). Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAff 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials*, 23(4), 1187–95. [L][SEP]
 16. Grigolo, B., Roseti, L., Fiorini, M., Fini, M., Giavaresi, G., Aldini, N. N., Facchini, A. (2001). Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials*, 22(17), 2417– 24. [L][SEP]
 17. Haleem AM, Chu CR. (2010). Advances in Tissue Engineering Techniques for Articular Cartilage Repair. *Oper Tech Orthop*, 20:76-89. [L][T][SEP]
 18. Hardmeier R, Redl H, Marlovits S. (2010). Effects of mechanical loading on collagen propeptides processing in cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med*, 4(1):1- 11. [L][SEP]
 19. Kang H, Peng J, Lu S, Liu S, Zhang L, Huang J, Sui X, Zhao B, Wang A, Xu W, Luo Z, Guo Q. (2014). In vivo cartilage repair using adipose-derived stem cell-loaded decellularized cartilage ECMscaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*, 8(6):442-53.
 20. Kawabe N, Yoshinao, M. (1991). The repair of full-thickness articular cartilage defects. Immune responses to reparative tissue formed by allogeneic growth plate chondrocyte implants. *Clin Orthop Relat Res*. 268:279-93.
 21. Kheir, E., Stapleton, T., Shaw, D., Jin, Z., Fisher, J., Ingham, E. (2011). Development and characterization of an acellular porcine cartilage bone matrix for use in tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 99(2):283-94.
 22. Knudson W, Casey B, Nishida Y, Eger W, Kuettner KE, Knudson, CB. (2000).

Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum.*; 43(5):1165-1174. [L][L][SEP][SEP]

23. Liao J, Shi K, Ding Q, Qu Y, Luo F, Qian Z. (2014). Recent developments in scaffold-guided cartilage tissue regeneration. *J Biomed Nanotechnol.* 3085-104.\$ 26.
- Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral. JM. (2015). Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol*, 33(1):35-42.
24. Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral. JM. (2015). Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol*, 33(1):35-42.
25. Matsiko A, Levingstone TJ, O'Brien FJ. (2013). Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair. *Materials.*; 6:637-668. [L][L][SEP]
26. Moradi, Ali., Sumit Pramanik, Forough Ataollahi, Alizan Abdul Khalil, Tunku Kamarul and Belinda Pingguan-Murphy. (2016). A comparison study of different physical treatments on cartilage matrix derived porous scaffolds for tissue engineering applications. *Sci Technol Adv Mater*, 12;15(6).
27. Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Young G, Shortkroff S, Louie LK, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. (1997). Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials.*; 18(11):769-76. [L][L][SEP]
28. Nehrer, S., Chiari, C., Domayer, S., Barkay, H., & Yayon, A. (2008). Results of chondrocyte implantation with a fibrin-hyaluronan matrix: a preliminary study. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 466(8), 1849–55. [L][L][SEP]
29. Nesic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P. (2006). Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Advanced drug delivery reviews.*; 58(2):300-22 [L][L][SEP]
30. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. (2010). Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials.*; 3(3):1863-1887. [L][L][SEP]
31. Pavesio, A., Abatangelo, G., Borriore, A., Brocchetta, D., Hollander, A. P., Kon, E., Marcacci, M. (2003). Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings. *Novartis Foundation Symposium*, 249:203-17. [L][L][SEP]
32. Pieper JS, Kraan PM, Hafmans T, Kamp J, Buma P, Susante JL, Berg WB, Veerkamp JH, Kuppevelt TH. (2002). Crosslinked type II collagen matrices: preparation, characterization, and potential for cartilage engineering. *Biomaterials.*; 23(15):3183-92.
33. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. (2010). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science.*; 35(4):403-40. [L][L][SEP]
34. Ross MH, Pawlina W. Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. 5a ed: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2007. p. 165-72, 77-81, 98-217. [L][L][SEP]

35. Schneider C, Lehmann J, van Osch GJ, Hildner F, Teuschl A, Monforte X, Miosga D, Heimel P, Priglinger E, Redl H, Wolbank S, Nürnberger S. (2016). Systematic Comparison of Protocols for the Preparation of Human Articular Cartilage for Use as Scaffold Material in Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*, 22(12):1095-1107.
36. Schwarz, Silke, Ludwig Koerber., Alexander F. Elsaesser., Eva Goldberg-Bockhorn., Andreas M. Seitz., Lutz Durselen.,^[1]^[SEP]Anita Ignatius., Paul Walther., Roman Breiter, and Nicole Rotter. (2012). Decellularized cartilage matrix as a novel biomatrix for cartilage tissue-engineering applications. *Tissue Eng Part A*, 18(21-22):2195-209
37. Selmi, T. A. S., Verdonk, P., Chambat, P., Dubrana, F., Potel, J.-F., Barnouin, L., & Neyret, P. (2008). d: outcome at two years. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 90(5), 597–604.
38. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health.*; 1(6):461-8. ^[1]^[SEP]
39. Van Susante JL. Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. (1999). *Biomaterials*. 20(13):1167-75. ^[1]^[SEP]
40. Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noel D. (2009). "Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors." *Trends Biotechnol.*; 27(5): 307-314. ^[1]^[1]^[SEP]^[SEP]
41. Yang Q, Peng J, Guo Q, Huang J, Zhang L, Yao J, Yang F, Wang S, Xu W, Wang A, Lu S. (2008). A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissueengineering with PKH26labeled chondrogenic bone marrow -derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 29(15):2378-87
42. Yang, Q., Peng, J., Guo, Q., Huang, J., Zhang, L., Yao, J., Lu, S. (2008). A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 29(15), 2378–87.

