

SOPORTES MENISCALES DE COLÁGENO I Y II, TEJIDO ARTIFICIAL MENISCAL Y SU MÉTODO DE ELABORACIÓN

SECTOR TECNOLÓGICO

Esta invención pertenece al campo de dispositivos médicos del sector de la salud. Específicamente se relaciona con implantes meniscales y su método de elaboración.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La rodilla es la articulación más grande e importante en los seres humanos y el menisco es una de las estructuras que cumple un rol trascendental en el mantenimiento de esta articulación porque le proporciona estabilidad, funcionalidad y carga dinámica. En la rodilla se encuentran dos meniscos: uno lateral y otro medial, ubicados entre el cóndilo femoral y el platillo tibial (Bryceland et al., 2017).

El menisco medial tiene forma de C y mide entre 40 a 45 mm de longitud y 27 mm de ancho; cubre entre el 51% al 74% de la superficie articular medial y se subdivide en cuerno anterior, cuerpo y cuerno posterior. El menisco medial es relativamente inmóvil porque se encuentra firmemente unido a la superficie del ligamento colateral medial y a su vez se une periféricamente a la cápsula articular (Markes et al., 2020). El menisco lateral tiene forma de O, presenta más variedad interindividual que el medial y cubre entre el 75% y el 93% de la superficie articular tibial. El cuerno posterior está adherido por el ligamento meniscofemoral al área intercondílea de la tibia y al cóndilo femoral medial, cerca de la inserción del ligamento cruzado posterior. El menisco lateral tiene mayor movilidad que el medial.

El menisco posee 3 zonas: una externa llamada zona roja-roja (vascular y neural), una interna llamada blanca-blanca (avascular y aneural) y una zona intermedia roja-blanca que separa las dos primeras y posee características de ambas zonas. Esta composición estructural determina la capacidad de respuesta regenerativa frente a una lesión, ya que la zona vascularizada responde más rápido y mejor que la zona blanca avascular (Chivers & Howitt, 2009).

La matriz extracelular del menisco está conformada principalmente por agua (que representa el 72% de su peso húmedo) y proteínas de la familia del colágeno (que representan el 22% del peso meniscal). El colágeno I es la proteína colágena más abundante en la zona externa del menisco ya que representa el 80% de su peso seco; mientras que los colágenos II, III, IV, VI y XVIII representan menos del 1% (Ricard-Blum, 2011). Los colágenos I y II están dispuestos en tres capas distintas y la mayoría de las fibras colágenas se encuentran en la capa intermedia orientadas circunferencialmente; esta capa, se intercala entre dos capas superficiales con fibras más cortas dispuestas radialmente que actúan como ataduras. La organización descrita le proporciona al menisco rigidez estructural y resistencia a la compresión (Bryceland et al., 2017).

Entre el 1 y el 2% del peso húmedo del menisco corresponde a proteoglicanos entre los que se encuentran agregano, decorina, biglicano, fibromodulina y lubricina; siendo el primero el más abundante. En la matriz extracelular del menisco también se encuentran glicoproteínas como la fibronectina, la trombospodina, la elastina y la condromodulina – I. Ésta última posee propiedades antiangiogénicas que contribuye a la limitada vascularización de la zona interna del menisco (Chen et al., 2017; Fujii et al., 2013).

Las lesiones meniscales se pueden clasificar según su patrón, profundidad y localización. De acuerdo con el patrón el desgarro puede ser vertical, horizontal, radial u oblicuo. De acuerdo con la profundidad puede ser de espesor parcial o complejo (estable o inestable). De acuerdo con la localización puede encontrarse en la zona avascular interna o zona blanca-blanca, en la zona intermedia blanca-roja o en la zona externa roja-roja (Markes et al., 2020). Los deportistas de alto rendimiento como jugadores de fútbol, baloncesto o patinaje reportan más de un tercio de todos los casos de patologías meniscales. En el 80% de los pacientes el desgarro de menisco está acompañado por desgarro del ligamento cruzado anterior (Monk et al., 2016). La sintomatología usual se manifiesta como dolor agudo después de que los pacientes han realizado movimientos de hiperextensión, rotación y sobreesfuerzos que desencadenan la lesión. El diagnóstico se realiza a través de una historia clínica completa con una adecuada anamnesis y un examen físico que evidencie dolor, edema y bloqueo en la articulación de la rodilla. Además, incluye pruebas específicas como el test de flexión de McMurray, la prueba de compresión de Apley y la prueba de Tesalia que evalúan el estado de los meniscos. Los análisis paraclínicos más utilizados para confirmar la sospecha clínica de un desgarro de menisco son los rayos X y la resonancia magnética funcional de la articulación de la rodilla (Maffulli et al., 2010).

Globalmente, la lesión del menisco tiene una incidencia anual de 60-70 personas por cada 100.000 habitantes al año; es más frecuente en hombres, en deportistas de alto rendimiento y de predominio en la rodilla derecha (Brelín & Rue, 2016; Mozafari et al., 2019). En el Reino Unido, Suecia y Francia es la forma más prevalente de lesiones intra-articulares de rodilla y la indicación más frecuente de intervención ortopédica (Dangelmajer et al., 2017). En los Estados Unidos, la incidencia es de 61 casos por 100.000 habitantes y se registran 850.000 procedimientos quirúrgicos por año relacionados con daños meniscales (Dangelmajer et al., 2017). En Dinamarca, los procedimientos meniscales realizados por cada 100.000 personas aumentaron de 164 a 312 entre el 2000 y el 2011 (Thorlund et al., 2014).

Actualmente, las estrategias terapéuticas están enfocadas a la reparación y regeneración del tejido meniscal, sin embargo, pocas son exitosas (Eli et al., 2011). Existen tratamientos conservadores que indican reposo y terapia física; otros que requieren procedimientos quirúrgicos invasivos o mínimamente invasivos (artroscopia), los cuales, dependiendo del nivel del daño, implican la menisectomía parcial o completa. La menisectomía acompañada de un trasplante meniscal, es el

procedimiento quirúrgico de primera línea en pacientes jóvenes (Lee et al., 2017). Para el trasplante se utiliza aloinjerto fresco, fresco-congelado, criopreservado y liofilizado (Mickiewicz et al., 2014); sin embargo, por tratarse de un aloinjerto esta intervención puede terminar en rechazo inmunológico, lesiones neurovasculares, infecciones, hematomas y trombosis (Arkel et al., 2002). Los sustitutos meniscales artificiales se han convertido en una alternativa a los aloinjertos debido a que estimulan la regeneración, tienen un bajo riesgo de rechazo y no están limitados por la cantidad de tejido donante (Mutsaerts et al., 2016). También, existen otras terapias que incluyen a los productos derivados de terapia génica, terapia celular y factores de crecimiento aplicados intraarticularmente las cuales se encuentran en fase preclínica o clínica (Eli et al., 2011).

Los sustitutos meniscales artificiales, considerados como productos de ingeniería de tejidos, se han propuesto para el tratamiento de lesiones meniscales de origen variado. Estos productos están constituidos básicamente por soportes, células, o soportes sembrados con células. La gama de soportes empleados como sustitutos meniscales desarrollados varía en su composición química, estructura, características mecánicas y bioactividad (Kean et al., 2017). Algunos de ellos están constituidos por hidrogeles o soportes obtenidos por liofilización (Longo et al., 2012; Resmi et al., 2020; Yan et al., 2012). Las células más utilizadas son los fibrocondrocitos autólogos expandidos in vitro; los cuales, se fijan en la lesión con la ayuda de colgajos o membranas de diferentes biomateriales (Cui et al., 2002).

Los biomateriales utilizados para elaborar soportes que reemplacen el tejido meniscal se agrupan en naturales, sintéticos e híbridos (Bahraminasab & Farahmand, 2017; Kean et al., 2017). Los materiales naturales mas utilizados son el colágeno I y el colágeno II (Mueller et al., 1999; Stone et al., 1992, 1997) y la proteína fibrosa de la seda (Mandal et al., 2011); mientras que los sintéticos, incluyen al poliuretano (Verdonk et al., 2011) y la policaprolactona (Baker et al., 2011). Los soportes de matriz descelularizada también se usan en regeneración del menisco en modelos animales, sin embargo, en clínica sólo se utilizan los soportes meniscales de colágeno y los soportes de menisco de poliuretano. En la Tabla 1, se incluyen algunos de los soportes meniscales elaborados con biomateriales sintéticos y naturales.

Tabla 1. Soportes meniscales elaborados con biomateriales sintéticos y naturales

Producto	Característica	Ref
Actifit® 	Origen: Sintético Compuesto por dos segmentos: uno de poliuretano y el otro de policaprolactona. Es altamente poroso, su periodo de degradación provee el tiempo necesario para	(Baynat et al., 2014)

Producto	Característica	Ref
NUsurface 	que el tejido del hospedero infiltre la estructura. Origen: Sintético Compuesto por policarbonato-uretano con reforzamiento de fibras circunferenciales en polietileno. Imita las características biomecánicas del menisco natural en estructura, rigidez, distribución de presión e hidrofiliidad.	(Linder-Ganz et al., 2010; McKeon et al., 2020)
Menaflex® ó CMI® 	Origen: Natural Matriz porosa de colágeno I y glicosaminoglicanos (condroitín sulfato y ácido hialurónico). Está entrecruzado con formaldehído y es esterilizado usando radiación γ. Los estudios muestran <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> que se genera un nuevo tejido después de su reabsorción.	

La Tabla 2 presenta un resumen de los biopolímeros - sintéticos, naturales e hidrogeles – empleados para la elaboración de implantes meniscales evaluados en modelos de cultivos celulares, preclínicamente y en humanos. Los estudios que han analizado la aplicación de los soportes meniscales elaborados con colágeno I en humano indican mejoría funcional (Grassi et al., 2014; Monllau et al., 2011; Zaffagnini et al., 2011).

Tabla 2. Biomateriales empleados para elaborar soportes meniscales 3D

Biopolímeros	Modelos	Resultados	Ref
PCL-PU (Actifit®)	Perros	Presencia de tejido similar a fibrocartílago en la región de interés después de 2 años.	(Philippe Beaufils & René Verdonk, 2010)
PCL-PU (Actifit®)	Pacientes humanos	Mayor fuerza para las suturas y mejor resistencia para las fuerzas que actúan dentro de la articulación de la rodilla.	(de Groot, 2005)

Biopolímeros	Modelos	Resultados	Ref
Ácido hialurónico y PCL	Ovejas	Estabilidad mecánica y tejido incrementados 6 semanas después de la implantación.	(Chiari et al., 2006)
Ácido hialurónico y PCL	Ovejas	Colonización celular a través de los constructos implantados, pocos cambios osteoartóricos.	(Kon et al., 2012)
PGA – Unido a PLGA	Conejo	Regeneración de fibrocartílago, presencia de colágeno I y II en el neomenisco.	(Kang et al., 2006)
Colágeno I (CMI®)	Pacientes humanos	Mejoramiento de la función de la rodilla y reducción del dolor.	(Grassi et al., 2014)
Colágeno I (CMI®)	Pacientes humanos	Alivio significativo del dolor y mejoramiento funcional; sin desarrollo o progresión de cambios degenerativos.	(Monllau et al., 2011)
Colágeno I (CMI®)	Pacientes humanos	Mejoramiento del dolor, nivel de actividad, y características radiológicas.	(Zaffagnini et al., 2011)
Colágeno I (CMI®)	BMSCs humanas	Incremento en la proliferación celular y diferenciación bajo la influencia de simulación mecánica y de perfusión.	(Petri et al., 2012)
Colágeno	Células meniscales humanas	Producción de matriz extracelular del menisco.	(Gruber et al., 2008)

PCL-PU: policaprolactona - poliuretano ;PCL: policaprolactona; PGA: ácido poliglicólico; PLGA: ácido poliláctico-co-glicólico ; CMI: soporte meniscal de colágeno. (**Adaptado de la referencia** (Mozafari et al., 2019)).

El colágeno se considera un material viscoelástico con alta resistencia a la tracción y baja extensibilidad. Su punto isoeléctrico está alrededor de pH 5,8. Es una molécula muy conservada en vertebrados, por eso su inmunogenicidad es baja (Rodríguez et al., 2018). Las fuentes más empleadas para obtener colágeno I son la piel o los tendones de origen porcino, bovino u ovino. Las más usadas para aislar el colágeno II son el cartílago bovino, porcino o aviar. También, se emplean tendones de cola de rata, los desechos de la industria del pescado (aletas, escamas y espinas) y de la esponja *Chondrosia reniformis* de (Soroushova et al., 2019).

El colágeno II es el componente más importante de la matriz extracelular del cartílago. Debido a que mantiene la morfología de los condrocitos articulares,

promueve la síntesis de elementos de la matriz extracelular y soporta la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales se emplea en la elaboración de soportes e hidrogeles para el tratamiento de lesiones del cartílago; sin embargo, puede ser artrítico (Irawan et al., 2018; Klatt et al., 2009). También se han descrito mezclas de colágeno I/II para preparar hidrogeles o soportes que se aplican en el cartílago articular. Los hidrogeles elaborados con colágeno I/II buscan sumar la actividad biológica del colágeno II y las propiedades mecánicas superiores del colágeno I (Panitch & Julie C. Liu Nelda Vázquez-Portalatín, 2016). Sin embargo, en la literatura revisada no se reporta su uso para la manufactura de sustitutos meniscales. La Tabla 3 presenta un resumen de productos elaborados con la mezcla de estos dos tipos de colágeno.

Tabla 3. Recientes diseños orientados a menisco y cartílago empleando colágeno I, II y I/II

Colágeno	Modelos <i>in vitro</i>	Presentación	Resultados	Ref
I	MC y SC Equinas	Hidrogel	Cocultivo. Fenotipo celular de menisco con expresión de GAG/ ADN y producción de colágeno I, II y agregano.	(Kremer et al., 2017)
I	Células meniscales humanas	Soporte (Electro-spinning)	Neotejido integrado con el tejido nativo de la zona avascular del menisco.	(Baek et al., 2016)
I	ADSC humanas	Gel	Nuevo método de fabricación de soportes por compresión plástica biaxial citocompatibles para menisco.	(Jeffrey A. Weiss Zitnay Jared, 2018)
II	BMSC humanas	Soporte	Soporte monomérico, poroso promueve la diferenciación condrogénica <i>in vitro</i> .	(Tamaddon et al., 2017)
I/II	Condrocitos autólogos de conejo	Soporte	Membrana de doble capa de colágeno (I/II) entrecruzado con carbodiimida biocompatible.	(Han et al., 2017)

MC: Células mesenquimales, SC: Células madre, ADSC: Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. BMSC: Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. GAG: Glicosaminoglicanos, ADN: Ácido desoxirribonucleico.

El entrecruzamiento es un proceso realizado por métodos físicos y químicos que permite inducir enlaces químicos entre los grupos funcionales de cada una de las fibrillas de colágeno con el fin de disminuir la tasa de degradación y aumentar el perfil mecánico del biomaterial según el tipo de sustituto. Para entrecruzar colágeno se utilizan agentes físicos (temperatura) y químicos; entre estos últimos se

encuentra el glutaraldehído (GA) que entrecruza los extremos de las fibrillas mediante la formación de bases de Schiff entre las lisinas o hidroxilisinas presentes en los péptidos (Kagan & Trackman, 1991). Aunque tiene la desventaja de que los grupos funcionales aldehído del GA son tóxicos para las células y pueden causar reacciones inflamatorias, su efecto citotóxico se reduce usando concentraciones bajas de GA (Oryan et al., 2018) y disminuyendo el glutaraldehído residual con lavados (Millán et al., 2021).

La genipina es un compuesto químico aislado del glucósido iridoide (genipósido) del fruto de la *Gardenia jasminoides*, que se usa como entrecruzante del colágeno (Butler et al., 2003). Presenta baja inmunogenicidad, mínima toxicidad e incrementa la diferenciación y proliferación celular. Interactúa con aminoácidos y proteínas formando un pigmento azul oscuro. El mecanismo del entrecruzamiento se basa en la reacción entre los grupos amino primarios de los aminoácidos lisina del colágeno con el átomo C3 de genipina, resultado de un ataque nucleofílico, que incorpora un nitrógeno terciario en el anillo de seis miembros en lugar del átomo de oxígeno. Al mismo tiempo, la genipina también puede polimerizarse por apertura del anillo en un entorno alcalino; este proceso, crea un entrecruzamiento intermolecular entre las moléculas con grupos aminos del colágeno. El efecto de la polimerización ha mostrado influencia en las propiedades mecánicas y la estabilidad térmica del colágeno (Mu et al., 2013).

PROBLEMA TÉCNICO

Los soportes meniscales aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) que cuentan con la certificación European Conformity (CE) son productos que no presentan la organización del menisco en zonas 1, 2 y 3 y que no poseen la composición de colágeno zonal característica del menisco natural. Para resolver este inconveniente, esta invención estableció el método para elaborar soportes que sustituyan al menisco natural cuando se requiera un implante meniscal durante una menisectomía parcial. Los soportes se caracterizan por tener una zona externa 1 de colágeno I, una zona intermedia o de interfase 2 de colágeno I y II, y una zona interna 3 de colágeno II, composición química característica de las zonas 1, 2 y 3 del menisco natural. El método de elaboración incluye el congelamiento y liofilización de una dispersión de colágeno I y una de colágeno II servidas consecutivamente en un molde diseñado con forma de cuña similar a la del menisco; así como, el entrecruzamiento del soporte. De este modo se obtuvo un soporte poroso con morfología de cuña, cuyo tamaño se puede ajustar al tamaño de lesión meniscal, lo cual, facilita su uso en menisectomías parciales. Las características fisicoquímicas y mecánicas hacen que el soporte sea citocompatible y que *in vitro* se adhieran y proliferen células madre mesenquimales que sintetizan tejido artificial.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Casa de la calidad. En gris se muestra el parámetro de diseño con mayor importancia técnica. La imagen muestra la relación: fuerte, media o débil, las interacciones entre cada parámetro asociado: altamente asociado, no muy fuertemente asociado o no asociado y evalúa la competencia: igual, mejor o peor. El ponderado absoluto con mayor importancia técnica fueron los biomateriales seguido del agente entrecruzante.

Figura 2. Vista superior e isometría del soporte meniscal de colágeno I/II con representación de las zonas: una zona externa de colágeno I que compone la zona 1 (101), una interfase que compone la zona 2 (102) y una zona interna de colágeno II que compone la zona 3 (103). Dimensiones de 140 mm x 10 mm, la zona de mayor espesor de 3 mm y la de menor espesor de 2 mm.

Figura 3. Vista de disposición del colágeno en el molde, en la cavidad de mayor profundidad (104) se sirve el colágeno I y en la cavidad de menor profundidad se sirve el colágeno II (105).

Figura 4. Sorción de fluidos de los soportes de colágeno I y I/II. En el eje de ordenadas se describe el porcentaje (%) de sorción de fluidos de los soportes (A-E) diferenciados por colores. El eje de abscisas corresponde a los seis tiempos de corte del ensayo expresados en horas. (n=4); (media $\pm$ DE); * $p \leq 0.05$ (** 0.01 *** 0.001).

Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (ESEM). Soportes correspondientes a los grupos A-E. Panel derecho presenta la vista longitudinal; panel izquierdo el corte transversal. Línea blanca equivalente a 200 μ m entre 150-200X

Figura 6.A. Análisis nanotopográfico (2D/3D) de los soportes A y B. Se presentan imágenes en planos 2D y 3D obtenidas por microscopía de fuerza atómica de cada una de las zonas de los soportes de los prototipos A y B. Zona 1 (colágeno I 5mg/g), zona 2 (interfase entre las zonas 1 y 3), zona 3 (colágeno II 5mg/g). Área de cada plano (20 x 20 μ m). La barra lateral de colores está expresada en nm.

Figura 6. B. Análisis nanotopográfico (2D/3D) de los soportes C y D. Se presentan imágenes en planos 2D y 3D obtenidas por microscopía de fuerza atómica de cada una de las zonas de los soportes de los prototipos C y D. Zona 1 (colágeno I 5mg/g), zona 2 (interfase entre las zonas 1 y 3), zona 3 (colágeno II 5 mg/g). Área de cada plano (20 x 20 μ m). La barra lateral de colores está expresada en nm.

Figura 6. C. Imágenes nanotopográficas 2D/3D del soporte E. Imágenes obtenidas por microscopía de fuerza atómica de cada una de las zonas del soporte E. Zona 1 (colágeno I 10 mg/g), zona 2 (colágeno I 10 mg/g), zona 3 (colágeno I 10 mg/g). Área de cada plano (20x20 μ m). La barra lateral de colores está expresada en nm.

Figura 7. Parámetros de amplitud de la rugosidad de los soportes de colágeno I/II. Información obtenida de las imágenes nanotopográficas por microscopía de fuerza atómica de cada una de las zonas de los soportes (A-E). Panel superior izquierdo: rugosidad media (Ra) expresada en nm. Panel superior derecho: rugosidad media cuadrática RMS-(Rq) expresada en nm. Panel inferior izquierdo: asimetría de la distribución (Ssk). Panel inferior derecho: curtosis. Zona 1 (colágeno I), zona 2 (colágeno I/II), zona 3 (colágeno II). Área de evaluación de cada plano (20x20 μm).

Figura 8. Resistencia a la compresión. Valores expresados en Megapascuales (MPa). Soportes correspondientes a los grupos A-E. (n=3); (media $\pm$ DE); * $p \leq 0.05$ = (<0.0001 '****' 0.0001 '***' 0.001 '**' 0.05 '*'). ns = ≥ 0.05 (diferencia no significativa).

Figura 9. Comportamiento reológico de los soportes de colágeno I/II. Se presentan las curvas reológicas obtenidas de los prototipos evaluados (A, B, C, D y E) previa hidratación. Temperatura 37 °C, módulo de almacenamiento ó elástico (G'), módulo de pérdida ó viscoso (G''), módulo complejo (G^*) (n=3).

Figura 10. ADSC cultivadas en frascos de poliestireno. Cultivos de ADSC incubados por 7 días. (A) Menor magnificación; (B) Mayor magnificación. Barra de escala:100 μm .

Figura 11. Citometría de flujo de las ADSC. Imágenes representativas de la detección y cuantificación de marcadores en ADSC. (A) Diagrama de puntos; histogramas: (B) CD45; (C) CD34; (D) CD90; (E) CD73; (F) CD105. Porcentaje (%) correspondiente a la cuantificación de la expresión de los marcadores analizados.

Figura 12. Curvas de crecimiento. Proliferación de ADSC sembradas en los soportes de los prototipos A-E: n=4; media $\pm$ DE; * $p \leq 0.05$ = (0.001 '**'. Ç

Figura 13. Adhesión de las ADSC. Se muestra el número de células adheridas a los soportes de los prototipos A-E a las 24h: n=4; media $\pm$ DE; ns = $p \geq 0.05$.

Figura 14. Análisis ESEM. Imágenes representativas de los soportes de los prototipos B, D y E sembrados con ADSC e incubados con DMEM suplementado. Medio de diferenciación (DMEM suplementado, IGF-I Y TGF- β 3). Barra de escala: 2 μm (magnificación= 15kX).

Figura 15. Análisis histológico. Se muestran imágenes representativas de cortes de soportes de los prototipos B, D y E sembrados con ADSC, cultivados durante 21 días y teñidos con H&E, safranina-O, azul alciano y picrosirius rojo. Control: soporte sin células sometido a las mismas tinciones. DMEM: cortes de los cultivos incubados con medio DMEM suplementado. DMEM+IGF-I/TGF- β 3: cortes de los cultivos incubados con medio de diferenciación (DMEM suplementado, IGF-I, TGF- β 3). Magnificación 20X.

Figura 16. Inmunotinciones. Imágenes de cortes de los soportes B, D y E sembrados con ADSC, cultivados durante 21 días y marcados con anti-colágeno I

(rojo- Alexa 568), anti-colágeno II (verde – Alexa 488), anti-agrecano (rojo-Alexa 568) y núcleos celulares (DAPI). Control: soporte sin células. DMEM: cortes de los cultivos incubados con medio DMEM suplementado. DMEM+IGF-I/TGF- β 3: cortes de los cultivos incubados con medio de diferenciación (DMEM suplementado, IGF-I , TGF- β 3). Magnificación 10X.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Ejemplo 1. Diseño integrado de producto y proceso de los soportes

En el desarrollo de los soportes meniscales de colágeno I/II se emplearon los requerimientos de diseño integrado de producto y proceso en el sector farmacéutico (Aponte et al., 2015), debido a que integra las principales metodologías de diseño en ingeniería de tejidos. Los atributos del consumidor se definieron entre quienes diagnostican, formulan y realizan intervenciones quirúrgicas en lesiones meniscales definidos como consumidores secundarios. Para esto, se diseñó y aplicó una encuesta a especialistas en ortopedia en la que se correlacionaron y priorizaron sus necesidades. A cada profesional encuestado se le formularon 16 preguntas, la ficha técnica de la encuesta y las preguntas formuladas se presentan en el Anexo A. El análisis de estas respuestas permitió transformar las necesidades en requerimientos funcionales, parámetros de diseño, variables de proceso, y a partir de estos, establecer los cuatro dominios del modelo axiomático (dominio del consumidor, dominio funcional, dominio físico y dominio del proceso) representados por medio de vectores; los cuales, consideraron y evaluaron el problema del diseño mediante dos axiomas: de independencia y de información en la matriz de diseño (Vallejo, 2004). En el modelo funcional se definieron los elementos en bloques, su interfase gráfica con el flujo de energía, materia e información y sus respectivas subfunciones. Complementando el diseño, se implementó el despliegue de la función de la calidad (QFD) (Blogg, 2013; Moldovan, 2014), que permitió convertir las necesidades de los ortopedistas en características de calidad identificando, categorizando los requerimientos, definiendo los parámetros de diseño, la matriz de relación y correlación en el esquema de la casa de la calidad. Finalmente, se estableció el diseño conceptual del proceso y se realizaron los soportes. Las pruebas de caracterización y bioactividad *in vitro* de los prototipos diseñados fueron seleccionadas según los criterios de evaluación de la ASTM F3223 – 17, los requerimientos funcionales obtenidos y los parámetros de evaluación de soportes en ingeniería de tejidos (ASTM International, 2017).

A continuación se muestran los resultados de cada pregunta de la encuesta aplicada:

Pregunta 1: ¿Los desgarros de menisco representan qué porcentaje de su consulta? El 80% de los encuestados reportó que entre el 25-50%; el 13% que entre el 50-75% y el 7% que era menor al 25% de los pacientes atendidos.

Pregunta 2: ¿Conoce qué son los implantes meniscales? El 100% de los encuestados contestó que conocen qué son los implantes meniscales de colágeno.

Pregunta 3: ¿Cuál es el tratamiento que usted más utiliza en los desgarros de menisco? El 67% de los encuestados indicó que la meniscectomía parcial; el 27% que la meniscectomía completa y un 6% manifestó que la sutura de menisco.

Pregunta 4: ¿Con qué regularidad prescribe los implantes meniscales de colágeno en el tratamiento de desgarros de menisco? El 100% de los encuestados contestó que nunca.

Pregunta 5: Si ha realizado intervenciones con implantes meniscales de colágeno ¿Cuáles son las ventajas de su aplicación en relación a los tratamientos convencionales? El 100% de los encuestados contestó que nunca había usado implantes meniscales.

Pregunta 6: ¿Cuál es el grado de dificultad para obtener los implantes meniscales de colágeno en el país? El 100% de los encuestados contestó que el grado de dificultad es alto.

Pregunta 7: Esta pregunta buscaba conocer si los ortopedistas conocían el costo de los implantes meniscales de colágeno. El 100% de los encuestados manifestó no haber utilizado estos implantes.

Pregunta 8: ¿A través de cuál procedimiento se realiza la intervención con implantes meniscales de colágeno? El 100% de los encuestados manifestó que es la Artroscopia (esta pregunta fue contestada con base en conocimientos teóricos y no prácticos, porque ninguno de los encuestados ha utilizado implantes meniscales de colágeno)

Pregunta 9: ¿El implante meniscal de colágeno se realiza acompañado de qué procedimiento? El 67% contestó que meniscectomía parcial y el 33% que meniscectomía completa (esta pregunta también fue contestada con base en conocimientos teóricos y no prácticos, porque ninguno de los encuestados ha utilizado implantes meniscales de colágeno)

Pregunta 10: ¿Los implantes meniscales de colágeno disponibles satisfacen sus necesidades en un implante meniscal? El 100% de los encuestados contestaron que no. (esta pregunta también fue contestada con base en conocimientos teóricos y no prácticos, porque ninguno de los encuestados ha utilizado implantes meniscales de colágeno)

Pregunta 11: ¿Cuál es la principal ventaja de los implantes meniscales de colágeno? El 67% de los encuestados respondió que la regeneración meniscal; el 20% opinó que el menor riesgo biológico y el 13% la fácil manipulación.

Pregunta 12: No fue contestada por los encuestados porque al no haber realizado implantes meniscales de colágeno, no pueden hablar de eventos adversos.

Pregunta 13: ¿La forma de semiluna de los implantes meniscales de colágeno es importante para la realización de la intervención? El 100% de los encuestados contestó que sí.

Pregunta 14: ¿Cuál puede ser la mayor desventaja de los implantes meniscales de colágeno? El 27% de los encuestados respondió que las bajas propiedades mecánicas; mientras que el 73% contestó sobre su rápida degradación.

Pregunta 15: ¿Considera que tiene suficiente información sobre la seguridad y eficacia de los implantes meniscales de colágeno? El 100% de los encuestados contestó que no.

Pregunta 16: ¿Si se produjeran implantes meniscales de colágeno nacionales, usted los usaría para el tratamiento de los desgarros meniscales? El 100% de los encuestados dijo que sí.

El análisis de los resultados de la encuesta aplicada permitieron concluir lo siguiente:

- Los desgarros de menisco representan el 25-50% de los casos atendidos por los ortopedistas consultados. Todos los encuestados tienen conocimiento sobre los soportes meniscales de colágeno y consideran que el tratamiento más utilizado en los desgarros de menisco es la meniscectomía parcial. Ninguno, ha usado soportes meniscales de colágeno.
- El acceso a los implantes meniscales en Colombia es difícil.
- El procedimiento quirúrgico para colocar soportes meniscales de colágeno es la artroscopia en la que se lleva a cabo una meniscectomía parcial.
- Las ventajas percibidas por los ortopedistas de los implantes meniscales son dos: que promueven la regeneración meniscal en el tejido hospedero y el menor riesgo biológico.
- La desventaja es su rápida degradación y bajas propiedades mecánicas.
- Los ortopedistas encuestados no tienen información sobre el costo de los implantes meniscales de colágeno en Colombia; sin embargo, en caso de que se produjeran localmente, los utilizarían en el tratamiento de los desgarros de menisco en que estén indicados.

En el análisis de las respuestas se priorizaron las ventajas y desventajas, el procedimiento quirúrgico y el acceso de los especialistas al implante, de mayor al menor porcentaje. Con estos resultados, siguiendo el modelo funcional de Stone (Stone & Wood, 1999), se definieron los atributos del consumidor, especificando lo esperado y lo que es susceptible de mejora en un soporte meniscal de colágeno. La Tabla 4 presenta los atributos del consumidor.

Tabla 4. Atributos del consumidor / Priorización de necesidades

Atributos del Consumidor/Necesidades
1. Eficacia en la regeneración meniscal en el tejido hospedero
2. Seguridad del implante (mínimo riesgo biológico)
3. Baja tasa de degradación
4. Altas propiedades mecánicas
5. Implante diseñado para meniscectomía parcial a través de artroscopia
6. Fácil adquisición

Los atributos del consumidor se convirtieron en el dominio del usuario, desde donde parten los demás elementos que contribuyen al diseño.

- **Dominio del usuario:**

1. Eficacia en la regeneración meniscal
2. Seguridad del implante
3. Baja tasa de degradación
4. Altas propiedades mecánicas
5. Implante para meniscectomía parcial mediante artroscopía
6. Fácil adquisición

- **Dominio funcional:**

Los requerimientos funcionales (RF) fueron derivados directamente de los anteriores atributos del consumidor. El RF más importante fue definido como la “Eficacia en la regeneración del tejido meniscal”. A partir de ahí se derivaron los RF de las subfunciones para el diseño del implante meniscal. Estos son:

Requerimientos Funcionales para la eficacia en la regeneración del tejido meniscal

RF1. Garantizar la bioactividad del producto

RF1.1: Asegurar la concentración de los biomateriales usados en el soporte.

RF1.1.1. Establecer la dispersión de los biomateriales.

RF1.2: Garantizar la estabilidad fisicoquímica de los biomateriales.

RF1.2.1. Estabilizar la degradación de los biomateriales.

RF2. Determinar que el producto sea seguro

RF2.1: Garantizar condiciones de esterilidad del producto.

RF2.1.1. Método de esterilización adaptado al producto.

RF2.2: Limitar el riesgo de rechazo inmunológico del producto.

RF2.2.1. Establecer condición de citotoxicidad negativa del producto.

RF3. Facilitar la implantación del producto en el tejido meniscal por artroscopía.

RF3.1: Permitir la ubicación local del producto.

RF3.1.1. Adaptación del producto a la zona correspondiente de la implantación.

RF3.2: Características mecánicas del producto compatibles con el área de implantación y manipulación.

RF3.2.1. Módulos de tracción y compresión viables para un sustituto meniscal.

- **Dominio físico:**

A continuación se describen los parámetros de diseño definidos a partir del dominio funcional para cada uno de los anteriores RF.

Parámetro de Diseño (PD) de cada uno de los RF

PD1: Concentración del biomaterial en el soporte

PD1.1: Concentración de la suspensión (mg/g)

PD1.1.1: Biomateriales (mg/g)

PD1.2: Agente entrecruzante (mg/ml)

PD1.2.1: Concentración del agente entrecruzante (%).

PD2: Implante meniscal estéril y no citotóxico (mm²)

PD2.1: Prueba de esterilidad (#)

PD2.1.1: Coeficiente de seguridad de esterilidad (CSE) # (10⁻⁶)

PD2.2: Viabilidad celular (%)

PD2.2.1: Citotoxicidad (<70%)

PD3. Implante meniscal (mm²) en relación con área (mm²) por zona del menisco

PD 3.1: Implante meniscal (mm²) en relación con área (mm²) del menisco a reemplazar.

PD 3.1.1: Implante de menisco con representación de cada zona (mm²).

PD 3.2: Implante meniscal (mm²) con caracterización mecánica (MPa).

PD 3.2.1: Módulo de tracción y compresión del implante (MPa).

El producto está indicado para una sola aplicación porque debe estar hecho de biomateriales bioactivos y biodegradables, con el fin de que interactúe con el entorno de la lesión promoviendo la regeneración del tejido meniscal a medida que se va degradando el soporte. Además, debe ser estéril e inmunocompatible para controlar el riesgo de infección y de rechazo. Sus características mecánicas deben facilitar su implantación en la zona afectada por artroscopia y cumplir función estructural en el tejido meniscal, siendo compatible con características de un sólido. Considerando lo expuesto, se establecieron las siguientes restricciones para el producto: i) Debe ser implantado intraarticularmente, ii) Debe ser un producto sólido y iii) Debe ser biodegradable y de aplicación única.

Se estableció así la cadena de funciones para tener claridad en los puntos de mejora como son: flujos de energía, materia e información. En el flujo de energía se encuentran cuatro determinantes: la fuerza (mecánica) el movimiento (humana), la presión (biológica) y la afinidad (química) los cuales permiten que el implante meniscal tenga bioactividad y cumpla su función de regenerar el tejido. El flujo de la materia corresponde al dispositivo médico (implante), mano-persona (quien elabora el implante, diagnostica e interviene al paciente) y el equipo de artroscopia a través del cual se realiza la meniscectomía parcial. El flujo de información (señal) se encuentra dirigido por el diagnóstico y control realizado a través de la resonancia magnética de rodilla determinando el tipo de lesión meniscal y aplicando la escala genovese en el seguimiento del implante después de la intervención.

Teniendo en cuenta la restricción de implantación intrarticular y la condición de que sea un producto sólido para conservar propiedades mecánicas inherentes al tejido meniscal, el diseño se orientó hacia un dispositivo médico tipo implante para aplicar artroscópicamente, elaborado con biomateriales constitutivos del menisco. Con este propósito definido se especificaron las subfunciones hacia el diseño del implante

desde la cadena de funciones: implante, paciente, mano-persona y equipo, que fueron agrupadas en el modelo funcional visible en el Anexo B.

El desarrollo del soporte contempló el uso de suspensiones coloidales de colágeno I y II (colágeno I/II) en ácido acético, que en la fase de preparación constituyan una zona de colágeno I, una zona de colágeno II y una interfase (mezcla de colágeno I/II) entre las dos. Además, la utilización de congelamiento y liofilización para obtener un producto poroso en forma de cuña que pueda ser utilizado después de ser esterilizado.

El modelo funcional permitió realizar ponderaciones de la información obtenida en los parámetros de diseño para el soporte meniscal. Se determinó la importancia de cada uno de los requerimientos funcionales y se relacionó de manera fuerte, media o débil con cada parámetro, lo que arrojó un ponderado absoluto en el cual los biomateriales ocuparon el primer lugar. Como resultado se encontró que en la evaluación de la competencia, todos los requerimientos fueron iguales a excepción de la adaptación del producto a la zona correspondiente de implantación en la cual los productos comerciales actuales no tienen desarrollo. La interacción entre biomateriales y los demás parámetros se encuentran en su mayoría altamente asociados, al igual que la citotoxicidad; el módulo de tracción y compresión que están altamente asociados al biomaterial y el agente entrecruzante (Figura 1).

Los dominios descritos inicialmente (usuario, funcional, físico y de proceso) fueron representados como vectores para considerar y evaluar el objeto de diseño dentro de dos axiomas (de independencia y de información). Esto se realizó a través de la asociación entre los requerimientos funcionales y los parámetros de diseño.

Al comparar cada requerimiento funcional con todos los parámetros de diseño establecidos se obtuvo una diagonal en la matriz de diseño (ver Tabla 5), indicando que se cumple con el axioma de independencia, esto quiere decir que es posible satisfacer los parámetros de diseño establecidos en cada requerimiento funcional. Sin embargo, se encontró que el parámetro de diseño PD.1.2.1., concentración de agente entrecruzante (%), podría modificar el requerimiento funcional RF3.2.1., módulos de tracción y compresión viables para un sustituto meniscal. Lo anterior demuestra que este diseño es parcialmente desacoplado.

Tabla 5. Matriz de diseño axiomático.

Requerimientos funcionales (RF)	Parámetros de diseño (PD)	PD1.1.1. Biomateriales (mg/g)	PD1.2.1. Concentración de agente entrecruzante (%)	PD2.1.1. Coeficiente de seguridad de esterilidad (CSE) (#)	PD2.2.1. Citotoxicidad (<70%)	PD 3.1.1. Implante de menisco con representación de cada zona (mm ²)	PD 3.2.1. Módulo de tracción y compresión del implante (MPa)
RF1.1.1 Establecer la dispersión de los biomateriales.		X	0	0	0	0	0
RF1.2.1. Estabilizar la degradación de los biomateriales.		0	X	0	0	0	0
RF2.1.1. Método de esterilización adaptado al producto.		0	0	X	0	0	0
RF2.2.1. Establecer condición de citotoxicidad negativa del producto.		0	0	0	X	0	0
RF3.1.1. Adaptación del producto a la zona correspondiente de la implantación.		0	0	0	0	X	0
RF3.2.1. Módulos de tracción y compresión viables para un sustituto meniscal.		0	X	0	0	0	X

La elaboración del soporte meniscal partió del diseño conceptual producto de la aplicación de los modelos de diseño previamente descritos. En el desarrollo del soporte se requirieron los siguientes insumos: colágeno I (biomaterial I), colágeno II (biomaterial II), ácido acético (solvente), agente entrecruzante (genipina), agua tipo I, etanol al 70%, molde y empaque (bolsas para esterilizar). Los biomateriales, al igual que los demás insumos, cumplieron con los estándares de calidad establecidos en la ASTM F3223 (ASTM International, 2017). Luego se procedió a calcular la cantidad de cada biomaterial requerida para elaborar los soportes.

Para obtener un soporte organizado en dos zonas y una interfase entre las dos (parámetro de diseño PD 3.1.1.) y dar una forma de cuña al soporte, similar a la del menisco nativo (Figura 2), se evaluaron 4 diferentes tipos de moldes:

- Molde 1: Diseño inspirado en la optimización de jeringas, con corte parcial en uno de los lados, el cual permitió servir el biomaterial I y II, con obtención de un producto en bloque con forma de semiluna. Presentó dificultades en las zonas del diseño para la utilización del biomaterial (colágeno I/II). El tipo de corte por prototipo meniscal no se adecuó a las dimensiones requeridas.
- Molde 2: Diseño cavitado meniscal, el molde permitía colocar el colágeno I en la zona más profunda de cada molde y en la externa el colágeno II. Tenía un sistema por presión en la cara inferior con el cual se desmoldaba. La desventaja fue que se realizó con las medidas de un menisco de conejo y era limitado para producción a gran escala. La placa de molde contenía 9 unidades.
- Molde 3: Diseño en placas con una zona 1 para colágeno I delimitada por la cavidad de mayor espesor y una zona 3 de menor espesor para colágeno II que permite la formación de una interfase mezcla de los dos biomateriales. El teflón permite su desmolde sin deteriorar el producto, el cual puede ser congelado y liofilizado en el mismo molde. Con capacidad para 5 soportes.
- Molde 4: Tiene capacidad para 10 unidades del producto, mantiene las cavidades para las zonas 1 y 3. Se obtiene un producto con extensión de hasta 140 mm x 10 mm, con los cortes transversales se mantienen la diferenciación por zonas obteniéndose un soporte con dimensiones de 140 mm x 10 mm en la zona 1, 140 mm x 20 mm en la zona 2 y 140 mm x 30 mm en la zona 3. Las Medidas del molde son de 20 cm x 30 cm y con capacidad para 10 soportes.

Los soportes obtenidos de los 4 moldes presentaron diferencias entre la respuesta a los parámetros de diseño, entre ellos, los moldes 3 y 4 se ajustaron a la constitución por zonas, así, los prototipos elaborados en ellos fueron sometidos a evaluación.

Ejemplo 2. Obtención de colágeno I

El colágeno I fue obtenido de fascia bovina proveniente de una planta de beneficio, desposte, desprese y acondicionamiento que cumple con los requisitos sanitarios exigidos por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). Después de limpiarlo manualmente para remover contaminantes, el tejido fue seleccionado y seccionado en pequeñas porciones (0.5 cm) que fueron lavadas con agua desionizada y alcohol al 70% (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania), para reducir la carga microbiana. En la fase siguiente, se eliminaron los remanentes de grasa mediante lavados con éter etílico (Panreac, España) y los fragmentos fueron sumergidos en ácido acético 0.5 N (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania). La suspensión fue homogenizada (Magic Clean Mg-3600), precipitada con NaOH 1.0 N (Panreac, España), y cuantificada por método gravimétrico; se rehidrató con ácido acético 0.05 N hasta obtener las suspensiones con las concentraciones deseadas de 5 mg/g y 10 mg/g (E. B. Suesca, 2013).

Ejemplo 3. Obtención de colágeno II

El colágeno II fue obtenido de tráquea bovina proveniente de una planta de beneficio, desposte, desprese y acondicionamiento que cumple con los requisitos sanitarios exigidos por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). Una vez en el laboratorio, se removieron los tejidos anexos a los anillos traqueales; los cuales fueron separados y lavados con agua desionizada, etanol al 70% (24 h) y etanol al 96% por (24 h) (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania). Los anillos limpios fueron fragmentados en pequeñas piezas (1cm²) que fueron lavadas con agua desionizada. El tejido cartilaginoso obtenido fue incubado con tripsina (Gibco, USA) en Buffer Fosfato Salino (PBS, pH 7.4, 24 h, 4°C) (Gibco, USA), para remover proteoglicanos. La suspensión resultante fue homogeneizada con Ultra-Turrax® (IKA Works, China), (10.000 rpm, 20 min) y se centrifugó (2659 x g, 30 min), el precipitado se lavó con agua desionizada y se resuspendió en ácido acético 0.5 N (pH 2.4), (Sigma-Aldrich, Merck, Alemania). La muestra se agitó (60 rpm, 32 h, 4°C), se centrifugó (2659 x g, 30 min) y el sobrenadante se descartó. Al precipitado obtenido se le agregó NaCl (Panreac, España), se agitó (60 rpm, 24 h) y se centrifugó (2659 x g, 30 min). El precipitado resultante se lavó con agua tipo II y se resuspendió en ácido acético 0.5 N hasta una concentración de colágeno II de 5mg/g (Soto, 2014).

Ejemplo 4. Preparación de soportes de colágeno I/II

Una vez obtenidas las suspensiones de los colágenos I y II, se sirvieron en los moldes elaborados teniendo en cuenta los parámetros de diseño establecidos

después del análisis de los resultados de las encuestas. Los soportes se diseñaron para que tuvieran una organización y composición similares a las del menisco: una zona externa de colágeno I que compone la zona 1 (101), una interfase que compone la zona 2 (102) y una zona interna de colágeno II que compone la zona 3 (103) (Figura 2).

El proceso de servir las suspensiones de colágeno I y II en el molde seleccionado implicó dos pruebas: una en la que se colocó la suspensión de colágeno I en la cavidad correspondiente a la parte externa del molde donde es más profundo (104), se congeló por 30 min y posteriormente se sirvió la suspensión de colágeno II en la parte interna donde el molde es menos profundo (105) (Figura 3). Luego se llevó nuevamente a congelar (-20°C) durante 24 h y liofilizar (Virtis, SP Industries, USA) durante 24 h. Debido a que el producto obtenido se separaba en la interfase, se probó otra metodología.

La segunda prueba se realizó sirviendo la suspensión de colágeno I en la zona más profunda del molde (104) y consecutivamente, se sirvió la suspensión de colágeno II en la zona menos profunda del molde (105) permitiendo que se mezclaran en la zona intermedia por 10 a 30 min y formaran la interfase. Luego se congelaron (-20°C) durante 24 h y después se realizó la liofilización (Virtis, SP Industries, USA) durante 24 h; el producto obtenido mantuvo la integridad del soporte en la interfase, por lo tanto, este fue el proceso de disposición del colágeno seleccionado para la preparación de los soportes de colágeno I/II.

La concentración de colágeno I en la suspensión fue de 5 a 10 mg/g en la parte más profunda del molde (104) y la concentración de colágeno II en la suspensión fue de 5 mg/g en la parte menos profunda del molde (105). En la Tabla 6 se muestran los prototipos de los soportes elaborados, las concentraciones de colágeno I y II empleadas y el porcentaje de agente entrecruzante utilizado para darles estabilidad mecánica y química.

Para el entrecruzamiento, los soportes de los prototipos B y D (Tabla 6) se sumergieron en una solución de genipina al 0.05% en etanol al 70% (Sigma-Aldrich, USA) durante 48 h. Luego, se lavaron dos veces con etanol (70%) durante 1 h y finalmente con agua para eliminar los excesos de genipina. Después del entrecruzamiento, los soportes se congelaron (-20°C) y liofilizaron durante 24 h. Finalmente, todos los prototipos fueron esterilizados con óxido de etileno.

Tabla 6. Prototipos de soportes

Prototipo	Colágeno I (mg/g)	Colágeno II (mg/g)	Entrecruzamiento Genipina (%)
A	5	5	0.00
B	5	5	0.05

C	10	5	0.00
D	10	5	0.05
E	10	-	0.00

Los prototipos A, B, C y D presentados en la Tabla 6 fueron elaborados con colágeno I y colágeno II; de estos, solamente se entrecruzaron con genipina los prototipos B y D. Adicionalmente, el prototipo E fue elaborado únicamente con colágeno I, con el fin de usarlo como control (ejemplo comparativo), debido a que los soportes meniscales disponibles son hechos a altas densidades de geles de colágeno I (10 mg/g) (Puetzer & Bonassar, 2013). La cantidad de colágeno en el soporte final es de 1.0 a 3.5 mg/cm² de colágeno I en la zona 1; 0.5 a 2.0 mg/cm² de colágeno I y II en la zona 2 y 0.2 a 0.7 de colágeno II en la zona 3.

Ejemplo 5. Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier

Para estos análisis se emplearon muestras de cada uno de los prototipos de 1 cm²; adicionalmente, se incluyeron genipina (1.0 mg) y gelatina (1.0 mg) como controles. Se utilizó un Espectrofotómetro Infrarrojo por Transformada de Fourier 4200 (Jasco, JP) empleando la celda de Reflectancia Total Atenuada (ATR). Las lecturas se realizaron con 4000 escaneos en promedio a 4 cm⁻¹ de resolución y en un espectro de 400 a 4000 cm⁻¹.

Esta técnica permitió la identificación de los grupos funcionales característicos del colágeno I y II en las muestras de los grupos A-D. La genipina y la gelatina fueron usadas como controles. Los espectros obtenidos muestran las bandas de absorción de la amida A correspondientes a los enlaces N-H (3302 cm⁻¹); los enlaces C=O de la amida I (1631 cm⁻¹), las bandas N-H (1548 cm⁻¹) y N-C-H (1454 cm⁻¹) de la amida II; el doblamiento y la elongación N-H / C-N (1238 cm⁻¹) características de la amida III. El colágeno II componente de los soportes de los grupos A-D mostró un espectro similar al colágeno I en las amidas A, I, II y III, en el que se evidencian las bandas distintivas del colágeno tipo II (1238 cm⁻¹ y 1338 cm⁻¹). Los espectros obtenidos indican que el colágeno I y el colágeno II en los soportes conservan las características químicas y no son modificados (desnaturalizados) por el proceso de elaboración como ocurre con la gelatina usada como control en este experimento. El espectro de la genipina presentó las bandas características de este agente entrecruzante (1086 cm⁻¹, 1103 cm⁻¹ y 987 cm⁻¹). Los soportes entrecruzados (B y D) no presentaron bandas asociadas al agente entrecruzante indicando que los lavados de los soportes eliminan los residuos del agente entrecruzante (Soto, 2014; Suesca et al., 2017).

Ejemplo 6. Ensayo de degradación enzimática

La degradación enzimática con una mezcla de colágenasa I/II (Sigma, USA) de los soportes se evaluó en diferentes tiempos (1, 2, 3, 4 h y en los días 1, 7, 14, 21 y

28). Esta mezcla de enzimas se empleó debido a que los soportes están hechos de colágeno I y II. Aleatoriamente se tomaron cuatro soportes – cada uno de 6 mm de diámetro - de cada prototipo. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL, se secaron (3 h, 60 °C), se pesaron (W_i) y en cada tubo se agregaron 500 μ L de una solución de colágenasa I (5 UI) y colágenasa II (5 UI) en Buffer Fosfato Salino (PBS, Invitrogen, USA). Las muestras se incubaron (37 °C) durante el tiempo establecido, se agregó EDTA 0.25 M (500 μ L/tubo), los tubos se colocaron a -20°C (2 min), se removió el sobrenadante, se hicieron dos lavados con agua destilada (1 mL) y se centrifugó (3469 x g, 10 min). Los soportes húmedos se liofilizaron (24 h) para remover el agua y se registró el peso final de cada soporte (W_f). El porcentaje de degradación (D%) fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$D\% = (W_i - W_f) / W_i \times 100$$

Dónde D% es porcentaje de degradación, W_i es el peso inicial seco y W_f es el peso final.

Todos los soportes analizados fueron susceptibles al efecto enzimático. Los soportes de los prototipos E (99%), C (88%) y A (72%) fueron los que más se degradaron, sin que se observaran diferencias significativas entre sus porcentajes de degradación ($p > 0.05$). Los que menos se degradaron fueron los soportes de los prototipos B (35%) y D (48%), entrecruzados con genipina al 0.05%. Los porcentajes de degradación de estos últimos soportes fueron significativamente menores ($p < 0.0157$) que los porcentajes de los soportes sin entrecruzar (A y C), comprobándose que el entrecruzamiento estabilizó estos soportes porque los hizo más resistentes a la degradación enzimática. (Li & Zhao, 2018; Suesca et al., 2017).

Ejemplo 7. Hidrofilicidad de los soportes

La hidrofilicidad de los soportes fue evaluada determinando los valores de sus ángulos de contacto (AC). Los AC de las muestras se midieron con un goniómetro automatizado modelo 295 (ramé-hart, USA). Antes de los ensayos, las muestras se colocaron en un desecador (24 h, 40% humedad relativa, temperatura ambiente). Luego, se tomaron fragmentos (75 mm longitud x 5 mm de ancho) de cada una de las zonas (1, 2 y 3) de los prototipos A, B, C y D y se colocaron sobre láminas portaobjetos. El AC se determinó empleando el método de la gota sésil aplicando 7 μ L de DMEM (Gibco, USA) a temperatura ambiente. Los análisis se repitieron tres veces, incluyeron muestras de las mismas dimensiones del prototipo E y en cada una de las mediciones se promediaron 5 gotas.

Los valores del ángulo de contacto obtenidos para los cinco prototipos elaborados se encuentran entre 49° y 81°, lo cual significa, que la superficie es humectable. Debido a que se midieron los ángulos de contacto de cada una de las tres zonas de los soportes, los valores obtenidos se presentan por zonas. Los factores de análisis considerados fueron la zona del soporte y el prototipo de soporte. Los ángulos de contacto medidos en las tres zonas del soporte (1, 2 y 3) no fueron significativamente diferentes ($p > 0.005$) entre sí. Sin embargo, al comparar cada

una de las zonas entre los soportes de los diferentes prototipos se encontraron diferencias significativas ($p < 0.005$). El promedio de ángulo de contacto de la zona 1 de los prototipos A (5mg Col-I/5 mg Col-II) y B (5mg Col-I/5 mg Col-II, entrecruzado) fue de $71.44^\circ \pm 8.56$ y $57.68^\circ \pm 6.33$, respectivamente. Aunque el ángulo de contacto fue menor en los soportes del prototipo B que en los del prototipo A, la diferencia no fue significativa ($p > 0.05$). Los ángulos de contacto de los prototipos C (10 mg Col-I/5 mg Col-II) y D (10 mg Col-I/5 mg Col-II, entrecruzado) fueron $51.74^\circ \pm 8.16$ y $53.18^\circ \pm 8.17$, respectivamente; además, no se observaron diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$). Sin embargo, fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que los ángulos de contacto de los soportes del prototipo E (10 mg Col-I). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el ángulo de contacto de la zona 2 de los soportes de los prototipos A ($66.39^\circ \pm 7.24$) y B ($64.42^\circ \pm 3.51$). Tampoco, entre los soportes de los prototipos C ($57.29^\circ \pm 5.48$) y D ($49.34^\circ \pm 7.69$). En esta zona solo los ángulos de contacto de los prototipos D y E fueron significativamente diferentes ($p < 0.005$). En la zona 3, el promedio del ángulo de contacto del prototipo A ($66.18^\circ \pm 8.64$) fue mayor que el del prototipo B ($54.40^\circ \pm 4.92$), pero la diferencia no fue significativa ($p > 0.05$). Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas entre los soportes de los prototipos C ($56.34^\circ \pm 8.74$) y D ($52.31^\circ \pm 7.99$); sin embargo, estos últimos valores y los de los soportes del prototipo B fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que el valor promedio de los soportes del prototipo E ($68.47^\circ \pm 6.31$). Tampoco se observaron diferencias significativas entre los ángulos de contacto de los prototipos A y E.

Estos resultados muestran que los soportes probados son lo suficientemente hidrofílicos para interactuar con los tejidos, pero no tanto como para disolverse al interactuar con fluidos tisulares (Niemczyk-Soczynska et al., 2020) Además, las diferencias significativas en ángulo de contacto observadas entre las zonas de colágeno I (zona 1) y colágeno II (zona 3) de los prototipos, desaparecen en la interfase (zona 2). Lo cual, muestra que la zona 2 del soporte consiste en una mezcla de colágenos I y II, en la que se evidencia una alteración en la hidrofiliidad.

Ejemplo 8. Capacidad de sorción de fluidos

La capacidad de sorción de fluidos fue evaluada gravimétricamente. Se tomaron muestras de los soportes secos con un punch de 6 mm de diámetro y se midió su espesor; luego, cada una de ellas se colocó en un pozo de una caja de cultivo de 24 pozos. Las muestras se secaron en un horno (60°C , 24 h), se pesaron (W_0), se sumergieron en 2 mL de PBS (pH 7.4) a temperatura ambiente y se colocaron en vacío en un liofilizador (5 min) para remover el aire. Posteriormente, se mantuvieron a 37°C y en los tiempos definidos de evaluación (2, 12, 24 y 48 h) se retiraron del PBS, se colocaron en papel filtro para retirar el exceso de líquido y se pesaron (W_e). En cada uno de los tiempos, la capacidad de sorción de fluidos de cada muestra (G) fue calculada de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$G = ((W_e - W_0) / W_0) \times 100$$

Dónde W_0 es el peso seco y W_e , es el peso húmedo de la muestra.

La capacidad de sorción de fluidos evalúa la interacción del soporte con líquidos, los cuales, *in vivo* aumentan su tamaño de poro y porosidad facilitando el transporte de nutrientes y demás moléculas que requieren las células para su mantenimiento, adhesión y proliferación (Lutzweiler et al., 2020). La Figura 4 presenta el gráfico obtenido de la evaluación en 6 tiempos (0, 0.5, 1, 2, 12 y 24 h) del porcentaje de sorción de fluidos. La capacidad de sorción de los soportes de cada prototipo aumentó significativamente ($p < 0.05$) a los 30 min, momento en el que alcanzaron el estado de equilibrio ya que después no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de sorción ($p > 0.05$) en función del tiempo. En todos los tiempos, los soportes del prototipo E de colágeno I sin entrecruzar (control) presentaron mayor capacidad de sorción que los soportes de los prototipos elaborados con colágeno I/II los cuales, en varios casos, presentaron porcentajes de sorción significativamente menores que el control. Por ejemplo, a los 30 min y 1 h de iniciado el ensayo solo se observaron diferencias significativas entre los soportes de los prototipos A y E ($p < 0.05$). A las 2 h hubo diferencias significativas entre los soportes D ($p = 0.0185$) y A ($p = 0.0135$), mientras que a las 12 h la diferencia fue significativa entre los soportes A y E ($p = 0.002$), A y C ($p = 0.0297$), A y D ($p = 0.0191$), E y los soportes C y D ($p = 0.0010$). Finalmente, a las 24 h el porcentaje de sorción de todos los soportes fue significativamente menor que el de los soportes del prototipo E [A ($p = 0.0014$), B ($p = 0.0349$), C ($p = 0.0086$) y D ($p = 0.0022$)]. Ver análisis inferencial en el Anexo C.

Estos resultados muestran que la presencia de los dos tipos de colágenos en los soportes afecta su capacidad de sorción. Además, indican que el entrecruzamiento no tuvo impacto en este parámetro porque no se observaron diferencias significativas entre los soportes no entrecruzados y entrecruzados de la misma composición (A vs B; C vs D). Estos resultados difieren con los obtenidos en otras investigaciones que encontraron diferencias significativas relacionadas con la capacidad de sorción y el entrecruzamiento (Mi et al., 2001; E. Suesca et al., 2017).

Ejemplo 9. Porcentaje de entrecruzamiento

La determinación del porcentaje de entrecruzamiento con genipina (0.05%) de los soportes B y D se realizó con el ensayo de ninhidrina comparando los grupos aminos libres de estos soportes con los soportes no entrecruzados A y C. Se mezclaron dos soluciones I (1.26g de ácido cítrico, 0.48g de hidróxido de sodio disueltos en 30 mL de agua tipo I) y II (1.2g de ninhidrina en 30mL de etilenglicol) durante 45 min, a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras y su respectivo control fueron colocadas por triplicado en tubos de 2 mL para ser pesadas y agregarles a cada una 1 mL de la mezcla de las dos soluciones (100°C, 20 min). Una vez descendió la temperatura, se agregó 1mL de isopropanol al 50% y se realizó la lectura de la absorbancia del sobrenadante en un lector de placas (TRIAD, Dinex, USA) a una longitud de onda de 560 nm. Los resultados obtenidos se analizaron con la siguiente ecuación para calcular el porcentaje de entrecruzamiento:

$$E\% = 100 (1 - (A_m/P_m)/(A_c/P_c))$$

Donde: E% es el porcentaje de entrecruzamiento, A_m es la absorbancia de la muestra entrecruzada, P_m es el peso de la muestra entrecruzada, A_c : es la absorbancia de la muestra control sin entrecruzar y P_c , es el peso de la muestra control sin entrecruzar.

Adicionalmente al ensayo de ninhidrina, debido a que los soportes al estar entrecruzados con genipina emiten autofluorescencia (590 nm) se evaluó cualitativamente esta característica mediante imágenes de cortes transversales de cada soporte de 5 μ m de espesor (micrótopo rotatorio CUT 5062, Slee medical, GmbH), los cuales fueron colocados sobre una lámina portaobjetos y observados en un microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse TS100, JP).

La reacción de entrecruzamiento depende de la concentración del agente entrecruzante utilizado, de los grupos aminos de las fibras de colágeno disponibles para la reacción, del tiempo y la temperatura. Para el entrecruzamiento de los soportes elaborados se escogió usar genipina al 0.05%, teniendo en cuenta los resultados de entrecruzamiento obtenidos en trabajo previos (21). No se encontraron diferencias significativas ($p = 0.3993$) al comparar el porcentaje de entrecruzamiento de los soportes de los prototipos B ($33.48 \pm 5.96 \%$) y D ($38.66 \pm 4.02\%$), a pesar de que estos se caracterizan por tener una concentración de colágeno I diferente (B: 5mg/g; D:10 mg/g). Así, los soportes obtenidos presentan un entrecruzamiento entre 27% y 43%. Este resultado difiere de hallazgos previos que indican que en presencia de la misma concentración de entrecruzante químico (genipina o glutaraldehído) el porcentaje de entrecruzamiento es menor cuando la concentración de colágeno I es mayor, probablemente porque el entrecruzante actúa como reactivo límite (Suesca, 2013).

Se ha descrito que la genipina al reaccionar con las fibras de colágeno para entrecruzarlo, emite autofluorescencia a una excitación de 590 nm visible en el canal rojo en un microscopio de fluorescencia (Hahn TR. Almog J, 2004; Nair et al., 2020). La evaluación de la autofluorescencia emitida por los soportes entrecruzados y no entrecruzados de todos los prototipos, evidenció que hay diferencias cualitativas entre ellos. La autofluorescencia de los soportes no entrecruzados (A, C y E) fue menor que la de los entrecruzados (B y D) y fue mayor en D - el soporte con mayor concentración de colágeno total- que en B – el soporte con menor concentración de colágeno total. Los datos descritos muestran que el colágeno I y el colágeno II al estar presentes en un mismo soporte, se comportan diferente a como lo hacen cuando están en soportes hechos con biomateriales puros.

Ejemplo 10. Caracterización microestructural

Con un microscopio electrónico de barrido Tescan Vega 3 (CZ) se obtuvieron microfotografías de cortes longitudinales y transversales de cada soporte. Con estas imágenes se evaluó la interconectividad, porosidad, tamaño de poro y ángulo de

orientación de los soportes (Soto, 2014; Suesca et al., 2017; Suesca, 2013). Las microfotografías fueron evaluadas usando el software ImageJ v.1.51u software (Wayne Rasband, NIH, USA).

En las imágenes representativas de los soportes de los diferentes prototipos se aprecia su microestructura porosa (Figura 5). La vista de la superficie longitudinal de los soportes del prototipo A (5 mg/g colágeno I/ 5 mg colágeno II) muestra fibras uniaxiales que forman canales con poros organizados unidireccionalmente. Por el contrario, en los soportes del prototipo B, elaborados con la misma concentración y entrecruzados con genipina, se observan fibras multiaxiales que forman poros organizados multidireccionalmente. Los resultados encontrados muestran un efecto del entrecruzante en la direccionalidad de los poros para los soportes de estos dos prototipos. En los soportes de los prototipos C (no entrecruzado) y D (entrecruzado con genipina), elaborados con 10 mg/g colágeno I/ 5 mg colágeno II, se formaron poros multidireccionales que no reducen su tamaño después del entrecruzamiento. La vista longitudinal de la superficie de los soportes del prototipo E, empleado como control debido a que tiene la composición de colágeno I que se encuentra en los sustitutos meniscales comerciales, también mostró formación de poros organizados unidireccionalmente.

El análisis de los cortes transversales muestra la estructura tridimensional de todos los soportes analizados. En los soportes del prototipo A se aprecian poros bien definidos que disminuyen de tamaño en el soporte del prototipo B entrecruzado con genipina confirmando lo observado en las imágenes de la superficie o longitudinales. En los soportes C y D - no entrecruzado y entrecruzado de la misma concentración –las imágenes presentadas no tienen la misma magnificación; sin embargo, muestran que el entrecruzamiento no afectó el tamaño de poro y que los soportes no colapsaron con el entrecruzamiento. Estos resultados son acordes a lo reportado por el grupo, ya que en concentraciones de genipina del 0.6% se ha descrito que la estructura colapsa mientras que en concentraciones de genipina inferiores (0.3%, 0.5% y 0.1%) muestran microestructuras porosas e interconectadas tanto para colágeno I como para colágeno II (Soto, 2014; Suesca, 2013).

El tamaño de poro de los soportes que se usan en ingeniería de tejidos determina la migración y unión de las células a las fibras que lo componen, así como el intercambio de nutrientes y desechos con el tejido en el que se injerta (Murphy & O'Brien, 2010), por eso, es importante evaluarlo. Los tamaños de poro fueron calculados teniendo en cuenta las mediciones realizadas en las tres zonas de los soportes de los diferentes prototipos. El tamaño de poro fue analizado en imágenes transversales, identificando el eje mayor y menor (a y b, respectivamente) de la medida de la elipse mejor ajustada a cada poro, siguiendo procedimientos descritos (Suesca et al., 2017; Suesca, 2013). El tamaño de poro (PS) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$PS=1.5 \times 2 \times \sqrt{(a^2-b^2)}/2$$

Los promedios de tamaño de poro encontrados, fueron: 103.32 $\mu\text{m} \pm 15.15$ (prototipo A), 88.98 $\mu\text{m} \pm 14.44$ (prototipo B); 98.51 $\mu\text{m} \pm 15.27$ (prototipo C); 120.6 $\mu\text{m} \pm 22.97$ (prototipo D) y 108.29 $\mu\text{m} \pm 14.40$ (prototipo E). Así, los soportes obtenidos presentan un tamaño de poro entre 74 μm y 144 μm . Los resultados del análisis inferencial de tamaño de poro se realizaron a través de una Anova de dos vías de clasificación para un modelo de regresión normal. Se tuvieron en cuenta los factores de entrecruzamiento y concentración de colágeno, los cuales presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). El test de comparaciones múltiples permitió determinar las diferencias significativas entre el tamaño de poro de los diferentes soportes.

Se encontró que el tamaño de poro de los soportes del prototipo A fue mayor que el de los soportes del prototipo B; también, que el tamaño de poro de los soportes del prototipo C fue menor que el de los del prototipo D. La comparación de los soportes A y B con los soportes C y D - elaborados con mayor concentración de colágeno I – mostró que en estos últimos el tamaño de poro aumentó después del entrecruzamiento. Lo cual no deja de sorprender porque la mayoría de los datos reportados indican que el tamaño de poro de los soportes de colágeno disminuye con el entrecruzamiento (Suesca et al., 2017). Aunque el tamaño de poro de los soportes del prototipo E (10 mg/g colágeno I) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el de los soportes del prototipo B, fue significativamente menor ($p < 0.05$) que el de los soportes del prototipo D. Este resultado no se esperaba porque se ha reportado que el entrecruzamiento disminuye el tamaño de poro (Grier et al., 2017), lo que indica que la presencia en los soportes del prototipo D de dos tipos de colágeno y dos concentraciones diferentes del biomaterial impacta en el tamaño de poro y causa este comportamiento.

La porosidad es un parámetro que permite medir el espacio vacío al interior del soporte. Su importancia radica en que impacta el crecimiento y distribución de las células que se siembran en los soportes (Sun et al., 2017). La porosidad se evaluó mediante el método de desplazamiento líquido (Espinosa et al., 2010; Loh & Choong, 2013; Suesca et al., 2017). Muestras (1 cm²) secas de los prototipos A, B, C y D y del control (E) se pesaron (W1), sumergieron en PBS (2 mL), desgasificaron (10 min) al vacío (Virtis, SP Industries, USA) y agitaron (60 rpm, 48 h, temperatura ambiente). Transcurrido este tiempo las muestras se removieron del PBS, se colocaron en papel de filtro para eliminar el exceso de PBS y se pesaron (W2). Cada muestra se colocó en un picnómetro seco de peso conocido (W3), el cual, se llenó hasta el aforo con PBS (25 mL) y se pesó (W4). Usando los pesos mencionados (W1, W2, W3 y W4) y la densidad del PBS (1.023 g/mL) se calculó el volumen de las fibras del soporte seco (Vf) y saturado con PBS (Vw). Las mediciones fueron realizadas por triplicado. La porosidad (P) de cada soporte fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$P(\%) = [(1 - V_f) / V_w] \times 100$$

La porosidad de los soportes de todos los prototipos estuvo entre 82 % y 92%, un rango que es compatible con el crecimiento celular (168.169). Los valores de

porosidad de los soportes evaluados fueron: $85.86\% \pm 7.92$ (A), $82.84\% \pm 4$ (B), $91.08\% \pm 7.46$ (C), $92.40\% \pm 5.05$ (D) y $87.03\% \pm 3.46$ (E). No se encontraron diferencias significativas en la porosidad de los soportes y no se evidenció efecto significativo de la concentración en la porosidad. Lo anterior sorprende porque otro estudio reportó que la porosidad disminuye cuando aumenta la concentración de colágeno y también por efecto del entrecruzamiento (Suesca, 2013).

El índice de orientación de poro da información sobre la direccionalidad de las fibras, las cuales, pueden estar paralelas (1) o perpendiculares (-1) al eje longitudinal del soporte (Suesca et al., 2017). El índice de orientación de poro (IO) se determinó analizando imágenes representativas de la superficie de cada soporte con Fiji plugins para MacOS. Para calcularlo se empleó la siguiente ecuación (Ashworth et al., 2018; Madaghiele et al., 2008):

$$IO = 2\cos^2 \beta - 1$$

Donde β es la relación entre el promedio del ángulo de las fibras de colágeno y el eje longitudinal del soporte.

Todos los soportes presentaron un índice de orientación de poro entre 1 y -1. Los valores encontrados para los soportes de los diferentes prototipos, fueron: 0.584 ± 0.009 (A); 0.392 ± 0.448 (B); -0.911 ± 0.013 (C); -0.792 ± 0.017 (D) y 0.994 ± 0.004 (E). Los índices de los soportes E y A, en su orden, fueron los más cercanos a 1, lo cual indica que sus fibras están más orientadas al eje longitudinal y confirma la unidireccionalidad de sus poros. Lo anterior, también reafirma los resultados del análisis de microscopía electrónica que mostraron la formación de canales unidireccionales en los soportes de estos dos prototipos.

El índice de orientación de los soportes del prototipo B (entrecruzado), fue menor que el de los soportes del prototipo A (sin entrecruzar). Aunque la diferencia no fue significativa ($p > 0.05$). Los índices de los soportes de los prototipos C y D fueron negativos y cercanos a -1, lo cual indica la multidireccionalidad de sus fibras y de los poros que las forman. En este caso, tampoco se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos a pesar de que los valores fueron diferentes y sugestivos de mayor multidireccionalidad en C que en D.

Los datos de índice de orientación de poro y el análisis de los soportes con ESEM presentados en esta solicitud de patente, muestran que cuando se preparan soportes con la misma concentración de colágeno I y II en los moldes diseñados, el agente entrecruzante afecta la orientación de los poros, lo cual podría deberse al proceso de congelación antes de someter los soportes a una segunda liofilización posterior al entrecruzamiento. La anova de una vía de clasificación para un modelo de regresión normal también mostró que los ángulos de orientación de A y B son significativamente diferentes ($p < 0.05$) a los de los soportes de los prototipos C y D. Estos resultados indican que la concentración de colágeno influye en la orientación de las fibras y poros de los soportes evaluados.

Ejemplo 11. Caracterización nanoestructural

La nanotopografía es importante en la evaluación de soportes porque está relacionada con el crecimiento y la diferenciación celular (Park & Im, 2014). La evaluación nanoestructural de cada uno de los soportes fue realizada en muestras secas (6 mm de diámetro, área aproximada de 24,8 mm²), usando un microscopio de fuerza atómica (AFM, MFP-3D-BIO, Asylum Research, USA). La obtención de las imágenes se realizó a través de un barrido del plano topográfico (superficial) de cada una de las tres zonas de los soportes con una punta AC240Ts (Oxford instrument, Reino Unido), en modo de contacto intermitente a 256 líneas de construcción y 7 Hz. Las pruebas de indentación se desarrollaron en modo de contacto continuo, utilizando la misma punta con una constante elástica aproximada de 1 nN/nm y una fuerza de 50 nN para la construcción de los mapas de fuerza que permitieron obtener el análisis elástico. Se realizaron 3 repeticiones y los resultados fueron analizados en el software WSxM v4.0 Beta 9.3 y Gwyddion v2.56 (Liaw et al., 2019). Las imágenes obtenidas fueron ajustadas para corregir el plano y el valor 0 (nm) en el eje Z.

En los resultados se obtuvieron imágenes del plano topográfico 2D/3D a nivel nanoestructural de los soportes de cada prototipo en cada una de las tres zonas, encontrándose diferencias entre los soportes, no entrecruzados y entrecruzados, elaborados con la misma concentración (A versus B; C versus D) de colágeno I y II y entre los soportes, no entrecruzados y entrecruzados, elaborados con diferentes concentraciones (A y B versus C y D) de colágeno I y II.

El aspecto de los soportes de los prototipos A y B es esponjoso y sus superficies parecen tener rugosidad similar en la zona 1, aunque después del entrecruzamiento la superficie adquiere una apariencia más compacta. En la zona 2, la interfase en donde se mezclan el colágeno I (5mg/g) y el colágeno II (5mg/g), la apariencia varía ya que en A se observan ondulaciones mientras que en B se evidencia el mismo aspecto esponjoso que se presentó en la zona 1 de estos soportes. En la zona 3 también se encontraron diferencias. En el soporte del prototipo A, se ve una superficie con muchas ondulaciones continuas que forman picos y valles mientras que en el soporte B se ven protrusiones granulares sobre una meseta llana (Figura 6.A). La cuantificación que se hizo de la rugosidad media y la rugosidad cuadrática mostró diferencias entre los soportes, aunque estas no fueron significativas (Anexo D). Lo anterior confirma que hay diferencias nanotopográficas asociadas con el entrecruzamiento con genipina entre los soportes de los dos prototipos.

La Figura 6.B presenta las imágenes representativas del plano topográfico de los soportes de los prototipos C y D. Aunque en la zona 1 el aspecto del primero es esponjoso, en el segundo se ve una estructura más continua con protuberancias o picos localizados en uno de los extremos del soporte. Lo anterior indica que al aumentar la concentración de colágeno I en esta zona, se afecta la nanotopografía comparada con la de los prototipos A y B. También, que el efecto del entrecruzamiento es más notorio en la nanotopografía de los soportes del prototipo D que en los del prototipo B. La zona 2 del soporte del prototipo C, aunque se parece

a la zona 1, muestra picos continuos que protuyen de la superficie en diferentes direcciones. En el prototipo D, esta zona también presenta picos, pero con valles más amplios que los observados en C. La zona 3 de los soportes del prototipo C se ve más llana que las zonas 1 y 2 anteriormente descritas y que las zonas 3 de los prototipos A y B. La zona 3 de C y D también exhibe regiones que parecen no estar en el mismo plano y que tienen una apariencia laminar en la que se identifican depresiones que sugieren su formación en planos diferentes (Li et al., 2019).

Los soportes del prototipo E fueron elaborados con colágeno I (10 mg/g), sin embargo, el análisis nanotopográfico también se hizo por zonas con el fin de observar si las diferentes zonas del molde empleado para su preparación tenían un efecto en este análisis. Efectivamente, la nanotopografía de la zona 1 del molde – que en todos los soportes fue usada para servir el colágeno I – fue diferente a la de las otras dos zonas, lo que muestra un efecto intrínseco del molde en las características de los soportes. La zona 2 presenta menos picos continuos y valles más amplios que la zona 1, mientras que la zona 3, se ve más homogénea (Figura 6.C).

De acuerdo con la clasificación microscópica de superficies basada en la medida la rugosidad media (Ra) de Albrektsson y Wennerberg (Albrektsson & Wennerberg, 2004), la nanotopografía de todos los soportes evaluados se considera lisa, ya que es menor a 0.5 μm . Este parámetro indica que tienen una menor superficie específica comparada con una superficie rugosa (Stylianou, 2017). Por otra parte, la clasificación de rugosidad nanométrica ($<100\text{nm}$) se ajusta a los resultados obtenidos, en donde valores de rugosidad evidenciados en la nanotopografía han sido reportados similares a los de tejidos naturales, lo cual puede tener un efecto en la adhesión, el crecimiento y la maduración celular, tal como ocurre en las células endoteliales venosas humanas cuando interactúan con superficies nanorugosas donde mejoran su adhesión y crecimiento celular (Cai et al., 2020).

En el panel inferior de la Figura 7 se presenta la asimetría de la distribución (Ssk) y la curtosis. La asimetría de distribución (Ssk) se relaciona con el predominio de picos (>0) o valles (<0), indicando la simetría de las alturas de la superficie (Romero et al., 2014) La Ssk del soporte A fue la mayor sugiriendo un predominio de picos en su nanoestructura. Lo anterior puede explicar el índice de orientación de poro y direccionalidad de las fibras observadas en las imágenes de microscopía electrónica de barrido. Respecto a la curtosis, este parámetro se asocia a los defectos de la superficie del soporte expresados como picos o valles muy pronunciados; así, la curtosis en el soporte D fue mayor para las zonas 1 y 2 respecto a los demás soportes, lo cual es congruente con la microestructura multidireccional de las fibras de colágeno y el efecto del entrecruzamiento. Cabe resaltar que en este mismo soporte la zona 3 tiene menor valor de curtosis respecto a los otros soportes evaluados, lo cual puede deberse a los cambios de composición de esta zona (colágeno II -5mg/g).

Ejemplo 12. Caracterización mecánica

Los soportes fueron sometidos a pruebas mecánicas siguiendo las indicaciones de las normas ASTM F3223 - 17 (ASTM International, 2017). Se determinó la resistencia de cada soporte a la tracción - con su respectivo módulo elástico - la compresión y la relación esfuerzo-deformación con la prueba de cizalla. Todas las muestras se evaluaron en condiciones de hidratación, con el objetivo de someter los prototipos a condiciones similares a las del tejido meniscal nativo.

La prueba de resistencia a la tracción se hizo con una Máquina Universal de Ensayos Mecánicos AG-IS (Shimadzu, JA) a temperatura ambiente, siguiendo las indicaciones de la norma ASTM D-638 (ASTM International, 2014). Para el ensayo se empleó una celda de carga de 5 kN calibrada entre 0.1- 0.5 N, con una velocidad de 1 mm/min. De cada prototipo de soporte se tomaron 3 muestras con la medida de la probeta No.V indicada por la norma mencionada. El área de cada una de las muestras se calculó midiendo su espesor y longitud con un estereoscopio SMZ (Nikon, JA). Antes de realizar la prueba, todas las muestras se sumergieron en DMEM (Gibco, USA) durante 15 min a temperatura ambiente. Con los datos obtenidos se elaboró la curva de deformación vs. esfuerzo con la que se calculó el módulo elástico de cada uno de los soportes.

El análisis estadístico de los resultados de tracción se realizó con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Este parámetro fue similar para los soportes de todos los prototipos y a pesar de no haber encontrado diferencias significativas, la resistencia de los soportes del prototipo A ($0.054 \text{ MPa} \pm 0.047$) fue mayor que la de los del prototipo B ($0.047 \text{ MPa} \pm 0.032$). Del mismo modo, la de los soportes del prototipo C sin entrecruzar ($0.034 \text{ MPa} \pm 0.016$) fue menor que la de los soportes del prototipo D entrecruzados ($0.073 \text{ MPa} \pm 0.001$). Los mayores valores de resistencia a la tracción fueron los de los soportes de los prototipos D y E ($0.065 \text{ MPa} \pm 0.009$). No se evidenció efecto de interacción entre el entrecruzamiento y la concentración de colágeno I/II de los prototipos ($p > 0.05$), tampoco, se encontraron diferencias significativas asociadas con el entrecruzamiento ($p > 0.05$).

La caracterización del comportamiento elástico de los soportes se hizo con la curva de tensión-deformación elaborada con los datos de la prueba de resistencia a la tracción a la que fueron sometidas las muestras hidratadas. En el análisis que se hizo, los soportes entrecruzados presentaron un promedio de módulo elástico ($0.046 \pm 0.0218 \text{ MPa}$) menor que el de los soportes sin entrecruzar ($0.0119 \pm 0.0063 \text{ MPa}$). Al comparar el módulo elástico de los soportes de los diferentes prototipos entre sí, los valores más bajos fueron los de los soportes no entrecruzados (A: $0.0103 \pm 0.0073 \text{ MPa}$; C: $0.0130 \pm 0.0057 \text{ MPa}$ y E: $0.0123 \pm 0.0068 \text{ MPa}$) y los valores más altos, los de los soportes entrecruzados (B: $0.0277 \pm 0.0082 \text{ MPa}$ y D: $0.0655 \pm 0.0087 \text{ MPa}$). En el análisis que se hizo por composición, los soportes de los prototipos C y D – elaborados con 10mg/g colágeno I/ 5mg/g colágeno II- tuvieron un promedio de módulo elástico ($0.039 \pm 0.030 \text{ MPa}$) superior al de los soportes de colágeno A y B – elaborados 5 mg/g colágeno I/ 5mg/g colágeno II – cuyo valor promedio fue $0.019 \pm 0.012 \text{ MPa}$. Estos datos indican que el entrecruzamiento y la concentración de colágeno I impactan este parámetro, lo cual fue corroborado por el análisis anova a dos vías de clasificación para un modelo de

regresión normal ($p = 0.002159$). También, por la diferencia significativa encontrada en las comparaciones hechas entre el soporte D (entrecruzado y con mayor concentración de colágeno I) y los soportes A ($p = 0.0000291$), B ($p = 0.0007$) y C ($p = 0.0000451$). Como era de esperarse, para el prototipo E su módulo elástico también fue significativamente diferente ($p = 0.0000401$) al del módulo de los soportes D. Los valores bajos del módulo elástico encontrados pueden explicarse porque las pruebas se realizaron con los soportes húmedos y es conocido que la hidratación del soporte disminuye las propiedades mecánicas del colágeno (Suesca, 2013). Se debe resaltar que los valores del módulo elástico del soporte D - aproximadamente 65.5 kPa - son similares a los reportados para la zona interna (zona 3) de matrices pericelulares de menisco porcino medial (66 kPa) (Sanchez-Adams et al., 2013).

El módulo elástico obtenido de las curvas de tensión- deformación fue menor al obtenido a partir de los mapas de fuerza realizados en el microscopio de fuerza atómica, lo cual se debe a que para estos análisis se usaron muestras secas de cada una de las zona de los soportes. Otro aspecto interesante de este análisis es que permite encontrar el módulo elástico de cada una de las zonas en que se dividió el soporte. Aunque las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$), en la zona 1 de todos los prototipos - correlacionada con la zona externa del menisco - el módulo elástico fue mayor en los soportes no entrecruzados (A: 468.171 ± 135.197 MPa; C: 152.178 ± 85.282 MPa) que en los soportes entrecruzados (B: 44.345 ± 21.459 MPa; D: 12.772 ± 7.797 MPa). El módulo elástico de la zona 2, correlacionada con la zona del menisco conocida como zona blanca-roja de los diferentes prototipos, tampoco fue significativamente diferente ($p > 0.05$). Sin embargo, los valores de los módulos elásticos de los soportes no entrecruzados (A: 23.668 ± 19.85 ; C: 30.614 ± 47.984) fueron menores que los de los soportes entrecruzados (B: 29.056 ± 10.097 ; D: 45.445 ± 62.297). En la zona 3, correlacionada con la zona interna del menisco, tampoco se encontraron diferencias significativas, los valores de módulo elástico encontrados fueron: soporte A: 3.699 ± 1.85 ; B: 24.77 ± 29.02 ; C: 5.91 ± 4.6 , D: 17.181 ± 19.8 y E: 12.85 ± 7.35 . En todos los valores el módulo elástico fue mayor que el módulo de la zona interna del menisco porcino (0.066 MPa) que ha sido reportado (Sanchez-Adams et al., 2013). En el mapa de fuerzas, sólo se encontró una diferencia significativa entre las zonas 1 y 3 del soporte A ($p = 0.0487$), la cual, puede deberse a las diferencias en composición de colágeno I (zona 1) y colágeno II (zona 3). A pesar de que el prototipo E tiene la misma composición de colágeno en todas sus zonas y de que no se encontraron diferencias significativas entre el módulo elástico de las zonas (1: 27.093 ± 23.73 ; 2: 78.33 ± 70.80 ; 3: 12.85 ± 7.35), los datos muestran que el diseño del molde empleado para su fabricación puede afectar este parámetro.

Los valores de módulo elástico obtenidos para los soportes desarrollados en este trabajo son superiores a los esperados para el módulo elástico de soportes elaborados con proteínas componentes de la matriz extracelular (Sun et al., 2017), además estos resultados son similares a los valores del tejido meniscal nativo porcino en la zona 1 ($0.151 \pm 0.038.2$ MPa) (Sanchez-Adams et al., 2013).

La prueba de compresión se hizo en la Máquina Universal de Ensayos Mecánicos AG-IS (Shimadzu, JA). Para ello, con un punch de 2 mm de diámetro se tomaron cinco muestras de cada una de las zonas (zona de colágeno I, zona de interfase constituida por la mezcla de colágeno I/II y zona de colágeno II) que constituyen los prototipos A-D; adicionalmente, se tomaron cinco muestras del prototipo E elaborado con colágeno I (control). Antes de iniciar la prueba, todas las muestras se hidrataron con DMEM durante 15 min a temperatura ambiente. Para este ensayo, se empleó la celda de carga de 5 kN calibrada a una velocidad de 0.2 mm/min.

Se utilizó una anova de dos vías para evaluar la significancia de las diferencias entre las zonas de un mismo soporte, entre los soportes y entre las zonas de los soportes. En todos los prototipos (A, B, C, D y E) las zonas (1, 2 y 3) de un mismo soporte no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) entre sí, sin embargo, hubo diferencias significativas entre las mismas zonas de los soportes de los diferentes prototipos. La resistencia a la compresión de todas las zonas de los prototipos A y B fue significativamente menor que la de los prototipos C, D y E. Lo anterior indica que la resistencia a la compresión aumenta al aumentar la concentración de colágeno. Llama la atención el que la resistencia de todas las zonas del soporte del prototipo C fuera significativamente mayor ($p < 0.05$) que la del prototipo D, con la misma composición y entrecruzado con genipina. Se ha reportado que la resistencia a la compresión disminuye cuando se usan concentraciones de genipina mayores a 1% en soportes elaborados con colágeno II y quitosán (Bi et al., 2011); lo mismo pudo ocurrir con los soportes del prototipo D a pesar de haber sido entrecruzado con una concentración menor (Figura 8, Anexo E).

El módulo de elasticidad transversal (cizalla) nos ofrece información sobre el comportamiento de los soportes cuando se exponen a la deformación por un esfuerzo cortante y es una característica importante porque induce cambios significativos en la morfología y el destino de las células madre (Akhmanova et al., 2015). La prueba de cizalla se hizo bajo barrido de frecuencia dinámica usando un sistema reométrico (C-VOR Bohlin Instruments, UK). Los soportes se analizaron entre dos placas rígidas previa inmersión de las muestras en un baño de DMEM a temperatura ambiente. Se aplicó una deformación externa compresiva del 10%, la temperatura se reguló a 37°C y se dejó equilibrar para posteriormente definir el perfil de deformación de corte sinusoidal, representado por la ecuación: $\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t)$ donde la amplitud, γ_0 , es de 0.05 y la frecuencia angular, ω , es creciente de 1 a 50 rad/s y el tiempo (t) es expresado en segundos. La magnitud del módulo de corte complejo se calculó a partir de la ecuación $|G^*| = T_0/\gamma_0$, asumiendo un comportamiento lineal de los datos. El módulo complejo G^* , se obtuvo del almacenamiento (G') y los módulos de pérdida (G'') se obtuvieron a partir de la ecuación $G^* = G' + iG''$ (Laun et al., 2014; Moutos & Guilak, 2010).

Los resultados obtenidos (Figura 9) indican que las propiedades viscoelásticas de los soportes aumentan en todos los soportes (A-E), ya que el valor del módulo de almacenamiento o elástico (G') y el módulo de pérdida ó viscoso (G'') aumenta en cada uno, indicando una relativa estabilidad de los prototipos predominando el componente elástico. El prototipo E es el más resistente al esfuerzo de cizalla,

comparado con los demás soportes; este dato se correlaciona con el menor módulo de Young, presentado por este prototipo e indicando que es más elástico. En todos los prototipos (A-E) se evidencia un comportamiento de tipo pseudoplástico, definido porque al aumentar el esfuerzo deformante disminuyen su viscosidad (Ortega et al., 2012). Esto es relevante en los componentes de la matriz extracelular de origen natural porque tienden a reorganizar su estructura bajo tensión, con un comportamiento que los hace viscoelásticos y propensos a la deformación plástica especialmente si son cíclicas o dinámicas como en el menisco (Levental et al., 2007).

Una vez caracterizados físicoquímica, microestructural y mecánicamente se escogieron soportes de los prototipos B, D y E, porque respondieron a los atributos del consumidor y a los parámetros de diseño, para evaluar su citocompatibilidad, proliferación, adhesión y diferenciación *in vitro*.

Ejemplo 13. Citotoxicidad de los soportes

El ensayo de citotoxicidad que permite determinar la viabilidad celular, fue realizado siguiendo los parámetros de la norma ISO 10993-5 (ISO, 2009) por triplicado. Se sembraron fibroblastos L929 (NCTC clone 929, CCL-1, ATCC TM) en platos de 96 pozos (1×10^4 células/100 μ L de medio) las células se incubaron en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (37 °C, 5% CO₂, 24 h). El método evalúa el lixiviado resultado de una extracción del soporte que se obtiene al aplicarles a cada uno de los soportes cloruro de sodio NaCl al 0.9% como medio solvente de extracción, pre-esterilizado por microfiltración con filtros de membrana 0.22 μ m e incubados (37°C, 24 h). Consecutivamente los medios de mantenimiento de los cultivos celulares de fibroblastos L929 fueron sustituidos por un medio conformado por DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, y 25% del extracto obtenido de cada soporte a evaluar. Como control negativo se usó DMEM y DMEM pre-incubado con silicona (0.2 g/mL) preesterilizados y microfiltrados. Como control positivo se utilizó DMSO al 25%. Después de la incubación el medio se removió, se adicionaron 50 μ L (1 mg/mL) de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) a las muestras en medio de cultivo sin rojo fenol y se incubó (37 °C y 5% CO₂, 2 h). Posteriormente, el sobrenadante se cambió por 100 μ L de DMSO y la absorbancia de cada muestra se midió a 560 nm con un lector de placas (TRIAD, Dinex, USA). La viabilidad de las células (V.C.) en cada soporte se calculó con la siguiente ecuación:

$$V.C. = (A/B) \times 100.$$

Donde A es el promedio de la absorbancia por muestra y B es el promedio de la absorbancia del cultivo de los fibroblastos L929 en medio estándar. Valores inferiores a 70% se consideraron citotóxicos.

En todos los casos se encontró que la viabilidad de los fibroblastos L929 expuestos a los lixiviados de los soportes de los diferentes prototipos fue mayor al 70%, requisito establecido por la norma ISO 10993-5 (ISO, 2009) para considerar que

una muestra es no citotóxica. Los porcentajes de viabilidad de los soportes de los prototipos no entrecruzados (E: 100.31 ± 0.72 ; A: 96.89 ± 1.53 y C: 88.06 ± 1.80) fueron significativamente mayores que los de los entrecruzados (B: 85.59 ± 1.16 ; D: 76.61 ± 0.73). Los valores de los soportes de los prototipos A y B ($p < 0.0001$) y los soportes de los prototipos C y D ($p < 0.0001$) fueron significativamente diferentes. Este resultado obedece al entrecruzamiento con genipina 0.05%, el mayor porcentaje de viabilidad se observó en los soportes del prototipo E.

Ejemplo 14. Ensayo de proliferación de células madre mesenquimales en el soporte

Las células madre mesenquimales se obtuvieron a partir de tejido remanente de liposucción de una paciente joven que dio su consentimiento informado y su uso fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia por medio del Acta 01-2020.

La muestra fue trasladada bajo cadena de frío (4°C). El tejido adiposo se pesó y trasladó a la cabina de flujo laminar donde se fraccionó en pequeños trozos que se digirieron enzimáticamente con colágenasa I (Sigma, USA), (37°C, 5% CO₂, 30 min, 100 rpm). Luego de la incubación, la enzima se diluyó con DMEM suplementado con SFB 10% y la suspensión resultante se filtró (cell strainer, Sigma, USA) y centrifugó (312 x g, 5 min). Después de descartar el sobrenadante, el pellet celular se resuspendió en 0.83% NH₄Cl y se hizo un conteo de células viables. Las células (5000 células / cm²) se sembraron en frascos de cultivo T75 (Lonza, USA) con DMEM suplementado con SFB 10%, penicilina 100 UI/ml y estreptomicina 100 µg/mL. El medio fue cambiado cada 72 h hasta cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%. En todos los experimentos se usaron células en cuarto pasaje.

Las células madre mesenquimales de tejido adiposo humano (ADSC), fueron caracterizadas de acuerdo con indicaciones de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici et al., 2006). Los criterios tenidos en cuenta fueron la adherencia al plástico y la expresión de marcadores. La adherencia a la superficie de los frascos de cultivo se confirmó con imágenes obtenidas en el microscopio de luz invertida Eclipse TS-100, Nikon, JP). La expresión de los marcadores de superficie CD73, CD105, CD90, CD45 y CD34 se evaluó por citometría de flujo (BD FACSCanto™ II, BD Biosciences-US), usando el software BD FACSDiva™ v. 6.1.3 (BD Biosciences, US). Para la marcación, las células (3×10^5) se resuspendieron en 500 µL de PBS y se incubaron (37°C, 30 min) con 5 µL del anticuerpo primario evaluado; luego, se lavaron con PBS (1X pH 7.4) y se centrifugaron (312 x g, 5 min). Para el análisis se tuvieron en cuenta aproximadamente 50.000 eventos por muestra y se incluyeron muestras de células sin marcar y una mezcla de células marcadas con todos los anticuerpos utilizados.

La Figura 10 muestra imágenes representativas de los cultivos obtenidos en frascos de poliestireno. Se observan células confluentes, adheridas a la superficie del frasco de cultivo y con la morfología elongada en forma de huso que caracteriza a las

células madre mesenquimales (Figura 10A). Estas características se pueden apreciar mejor en la imagen de mayor aumento (Figura 10B).

La Figura 11 muestra los resultados de la detección y cuantificación de los marcadores de superficie mediante citometría de flujo. Las células derivadas de tejido adiposo expresaron los marcadores CD73, CD105, CD90 y no expresaron o expresaron niveles bajos de los marcadores CD45 y CD34. Los datos mostrados confirman el linaje de las células madre mesenquimales que fueron empleadas en los ensayos de bioactividad *in vitro*.

Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (ADSC) se sembraron 100×10^3 células/ 0.28 cm^2 ($357.142 \text{ células/cm}^2$) de los soportes A, B, C, D y E (control). Después de incubarlas (37°C y 5% CO_2) durante 30 min, se agregó 1 mL de MEM y se volvieron a incubar en las mismas condiciones por 24 h, 3, 7 y 14 días. Cumplido el tiempo el medio se retiró, se lavaron los soportes cultivados con células con PBS, se adicionaron 500 μL de MTT (1 mg/mL MEM) por soporte cultivado y se incubó por 4 h (37°C , 5% CO_2). Después de volver a lavar con PBS (1 mL), se adicionó 1 mL de DMSO y se agitó para solubilizar el formazán producto de la reacción. De cada muestra se tomaron 100 μL , se colocaron en una placa de 96 pozos y se midió su absorbancia (560 nm) (TRIAD, Dinex, USA). Los valores de absorbancia fueron interpolados dentro de una curva de calibración elaborada con un número de células conocido. El experimento se realizó con 4 repeticiones.

Los resultados muestran que en el día 14 el número de células sembradas aumentó en los soportes de los prototipos A, B, D y E; sin embargo, en los soportes del prototipo C el número de células disminuyó (Figura 12, Anexo F). Al realizar el análisis estadístico solo se encontraron diferencias significativas entre el número de células de los soportes B y C. Los datos de proliferación celular indican que, excepto en el prototipo C, las ADSC crecieron en todos los soportes. Además, confirman los resultados del análisis de citotoxicidad porque aunque el número de células a los 14 días de cultivo fue menor en los soportes del prototipo C, el porcentaje de disminución no fue mayor al 15%.

Ejemplo 15. Ensayos de adhesión celular

Estos ensayos evaluaron la adhesión de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (obtenidas como se describió en el ensayo de proliferación celular) en los soportes, 24 h después de la siembra y la presencia de células en los soportes a los 14 días de cultivo. La adhesión de las células a los soportes cultivados a las 24 h, se analizó empleando la prueba de MTT previamente descrita. Para evaluar la presencia de células en los soportes después de 14 días de cultivo en los prototipos B, D y E, se sembraron 5.0×10^4 células por soporte y se incubó usando las condiciones descritas en el ensayo de proliferación celular. Los soportes se removieron del medio de cultivo, se lavaron con PBS (1X, pH 7.4), se fijaron durante 1 h con paraformaldehído (4%), se congelaron (-20°C , 1 h) y se liofilizaron (Virtis, SP Industries, USA) durante 24 h. Los soportes liofilizados se

recubrieron con oro y se observaron con un microscopio electrónico de barrido (Tescan Vega 3, CZ).

En los soportes de todos los prototipos se adhirieron células sin que se observara diferencias significativas en el número de células adheridas entre los soportes. No se evidenció efecto de interacción entre el entrecruzamiento y la concentración de colágeno I/II de los prototipos ($p > 0.05$); tampoco se encontraron diferencias significativas asociadas con el entrecruzamiento ($p > 0.05$) (Figura 13, Anexo G).

Las muestras de los soportes de los prototipos desarrollados sembrando ADSC e incubadas por 14 días se analizaron con ESEM (Figura 14). Los resultados indican la presencia de células adheridas en los soportes incubados con DMEM y en los soportes incubados con medio de diferenciación (DMEM suplementado con IGF-I y TGF-beta 3). Este ensayo solamente se hizo con los soportes de los prototipos B, D y E debido a que en estos prototipos el análisis de proliferación células encontró mayor proliferación celular y el análisis de degradación enzimática menor porcentaje de degradación.

Ejemplo 16. Diferenciación celular en cultivos 3D.

En muestras (6 mm de diámetro) de los soportes B, D y E se sembraron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (1.5×10^5 células /cm²) y se cultivaron con DMEM suplementado en platos de 24 pozos (37°C, 5% CO₂, 24 h). Al finalizar la incubación, los soportes sembrados se cambiaron a un nuevo plato - para descartar las células que no se adhirieron - y se incubaron con medio de diferenciación (suplementado con DMEM, 10 ng/mL de IGF-I recombinante humano y 10 ng/mL de TGF-beta 3 recombinante humano) durante 21 días, cambiando el medio cada 48 h. Se emplearon cultivos incubados con DMEM sin factores de crecimiento (IGF-I , TGF-beta 3) como control negativo (Liang et al., 2018). Este experimento se realizó por triplicado.

Para el análisis histológico, las muestras se fijaron con paraformaldehído (4%, CAS 30525-89-4 No. Catálogo 104005, Merck Millipore) en PBS (1X, pH 7.4) a 4°C durante 24 h. Después de su fijación, los soportes cultivados se cortaron con un micrótopo rotatorio (CUT 5062, Slee medical, GmbH) en secciones de 5 μ m y se tiñeron con hematoxilina-eosina, alcian blue, safranina O-Fast Green (Saf O) y picrosirius red. Los cortes fueron visualizados con el microscopio de luz (Nikon, Eclipse Ci, JP) y la tinción con picrosirius red fue observada con el microscopio de luz polarizada (Olympus BX51, JP). Como control se usaron soportes de los tres prototipos sin células y teñidos con la correspondiente tinción.

La Figura 15 presenta los resultados obtenidos en los cortes teñidos con H&E alcian blue, safranina O-Fast Green y Picrosirius red. En la imagen obtenida con H&E se observan células interconectadas por matriz eosinófila que aumentan en número al incubar con medio de diferenciación, excepto en los soportes usados como control (E). El número de células fue mayor en el soporte del prototipo B que en los soportes D y E. Llama la atención, que en la imagen del soporte E incubado con el medio de

diferenciación se evidencia la formación de matriz extracelular sólida homogénea eosinófila, con lagunas de forma redondeada características de fibrocartílago.

La tinción con safranina-O es útil para identificar zonas en las que se expresan proteoglicanos, se tiñen con una tonalidad vinotinto intensa. En general, la tonalidad vinotinto fue más intensa en los cultivos incubados con el medio de diferenciación que en los que fueron incubados con DMEM. El soporte del prototipo D cultivado con medio de diferenciación, tiñó con mayor intensidad que los soportes de los prototipos B y E incubados con el mismo medio. Lo anterior muestra que las células sembradas en el soporte D (colágeno I -10mg/g y colágeno II -5mg/g entrecruzado con genipina 0.05%) producen más proteoglicanos que las que se sembraron en los soportes B y E cuando se cultivan con el medio de diferenciación. El azul alciano también permite detectar la expresión de proteoglicanos, los cuales confieren a las zonas donde se encuentran color azul o verde azulado. Los cortes del soporte D fueron positivos para esta tinción en los dos medios empleados, mientras que los soportes B y E fueron negativos. En el caso de este último soporte, se volvió a evidenciar la matriz abundante y densa observada con la tinción H&E. Finalmente, para identificar colágeno I se usó la tinción histológica de picrosirius rojo, la cual, se visualiza mediante técnicas de polarización debido a que el colágeno I es birrefringente y sus subunidades se orientan en el mismo sentido del eje de las fibras (Samar et al., 2012). Esta tinción fue positiva en todos los cortes evaluados, tanto en los obtenidos de los cultivos con DMEM suplementado como en los que se incubaron con medio de diferenciación, indicando la presencia de colágeno I en todos los soportes sembrados con células mesenquimales.

También se hizo análisis con inmunofluorescencia de los cultivos 3D después de 21 días de incubación, los cuales fueron fijados por inmersión con paraformaldehído 4% (CAS 30525-89-4 No. Catálogo 104005, Merck Millipore) durante 20 min, posteriormente el soporte cultivado fue deshidratado mediante gradientes de alcoholes (70, 80, 90, 100% v/v, CAS 64-17-5; No. Catálogo 107017, Merck Millipore), se aclararon con xileno (CAS 95-47-6 No. Catálogo 109798, Merck Millipore), se embebieron en parafina de bajo punto de fusión (Histosec® No. Catálogo: 111609, Merck Millipore). Una vez montadas las muestras, se realizaron cortes con un micrótopo rotatorio (CUT 5062, Slee medical, GmbH) de 5 μ m de espesor y fue extendido en láminas cargadas. Para iniciar el proceso de inmunofluorescencia se rehidrataron las muestras en las láminas con 3 lavados con PBS (10mM) durante 5 minutos cada vez. Luego a las láminas correspondientes a la inmunotinción para colágeno II se les realizó digestión enzimática con pepsina 1mg/ml en Tris-HCl-pH 2.0 por 3 min, 37°C, como paso adicional. A continuación las láminas para las tres inmunotinciones (Colágeno I, colágeno II y agregano) se bloquearon con albúmina al 3% en PBS (10 mM) durante 30 min a temperatura ambiente. Se adicionaron los anticuerpos primarios (anticolágeno I, anticolágeno II, antiagregano, mezcla de anticolágeno I y II) solubilizados en la solución de bloqueo, se incubó en cámara húmeda (4°C, 12 horas) y se lavó con PBS (1X, 5 min cada vez por 3 veces). Luego, las muestras se incubaron (2 h) con el anticuerpo secundario diluido en la solución de bloqueo protegidas de la luz en cámara húmeda. Terminada la incubación, las muestras se lavaron con PBS 10 mM (3

veces, 5 min cada vez), se aplicó DAPI diluido en PBS 10 mM (Molecular Probes, Thermofisher, USA) a cada muestra y se incubaron (10 min). Para el montaje de las muestras se usó Antifade (Molecular Probes, Thermofisher, USA). Las muestras se conservaron a 4°C protegidas de la luz, hasta su observación en el microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse TS100, JP). Este análisis incluyó las tres zonas de los soportes y al igual que en el análisis histológico, en todos los casos se incluyó como control una muestra del mismo soporte sin células e inmunoteñida con los mismos anticuerpos (Figura 16). Con el objetivo de eliminar la señal de inmunofluorescencia emitida por los biomateriales de colágeno I en la zona 1 y 2, y colágeno II en la zona 2 y 3, se estandarizó una exposición que disminuía la intensidad de la señal en los controles, es importante aclarar que en los soportes sin células usados como control se evidenció intensidad de fluorescencia roja en la zona 1 que fue visiblemente reducida en la zona 2 y no se apreciaba en la zona 3. Por su parte, la tinción para colágeno II evidenció intensidad de fluorescencia roja en la zona 1 que fue visiblemente reducida en la zona 2 y no se apreciaba en la zona 3. Por su parte la tinción para colágeno II evidenció la falta de emisión de fluorescencia en la zona 1, una tenue fluorescencia en la zona 2 y mayor intensidad en la zona 3, lo anterior muestra que existe una conformación estructural zonal con distribución en la composición de biomateriales similar a lo esperado en un menisco nativo.

El soporte B expresó colágeno I, colágeno II y agrecano en la zona 1 del soporte, sin importar el medio utilizado. Sin embargo, la señal fluorescente del colágeno II aumentó en el cultivo incubado con el medio de diferenciación. En la zona 2 también se observó expresión de los tres compuestos de matriz extracelular evaluados. No obstante, en el cultivo incubado con medio de diferenciación solo se detectó la fluorescencia de colágeno I y II y esta última fue mayor que la observada en el medio DMEM. En la zona 3 se evidenció la señal fluorescente de los tres compuestos. Aun así, la fluorescencia del colágeno I aumentó y la del agrecano disminuyó en el cultivo incubado con medio de diferenciación.

En los cultivos con DMEM de los soportes del prototipo D, las señales del colágeno I y el colágeno II presentaron mayor intensidad que los controles y menor intensidad que los cultivos incubados con medio de diferenciación en todas las zonas. La señal fluorescente del agrecano tuvo la misma intensidad en las tres zonas de los cultivos realizados en los dos medios. Solamente en los cultivos incubados con medio de diferenciación, el marcaje de las tres zonas de los soportes del prototipo E fue positivo para colágeno I. Aunque también fue positivo para colágeno II en los cultivos realizados en presencia de los dos medios, la señal disminuyó en los cultivos incubados con medio de diferenciación. El agrecano, a pesar de haber sido detectado en los controles, fue negativo en los dos tipos de cultivo.

La imagen de los soportes cultivados con el soporte E y expuestos al medio de diferenciación emiten una señal fluorescente correspondiente a la autofluorescencia reportada del colágeno I y colágeno II. Esta autofluorescencia es una demostración indirecta de que las células están produciendo colágeno II, ya que este compuesto no se incluyó en la composición del soporte. En el soporte E, que fue utilizado como ejemplo comparativo de soportes meniscales de colágeno I que están en el

mercado, no se detectó la expresión de agregano. En los soportes B y D preparados con zonas de colágeno I y colágeno II se expresó este proteoglicano en todas las zonas del soporte.

El conjunto de resultados descritos confirman lo observado en el análisis histológico, y muestran que el medio de cultivo y la composición de los soportes impactan la expresión de las tres moléculas estudiadas. Además, demuestra que en el tejido artificial formado, las células madre mesenquimales se diferenciaron a fibrocondocitos en los prototipos B y D.

Análisis estadístico

Para hacer el análisis estadístico se realizaron dos diseños experimentales, uno del proceso de caracterización y el otro de bioactividad in vitro. Se ajustó un modelo de regresión normal para evaluar el efecto del entrecruzamiento y la concentración de colágeno I/II de cada soporte. Dependiendo del tipo de respuesta de las variables analizadas en la caracterización de los soportes de colágeno I/II se usaron modelos de regresión logística. Se aplicó un modelo ajustado de análisis de varianza (Anova) y test de comparaciones múltiples, para establecer la significancia de la diferencia ($p < 0.05$). El análisis estadístico se realizó con el software R, versión 4.0.2 y GraphPad Prism 8 versión 8.4.3.

REFERENCIAS

- Akhmanova, M., Osidak, E., Domogatsky, S., Rodin, S., & Domogatskaya, A. (2015). Physical, Spatial, and Molecular Aspects of Extracellular Matrix of In Vivo Niches and Artificial Scaffolds Relevant to Stem Cells Research. *Stem Cells International*, 2015, 167025. <https://doi.org/10.1155/2015/167025>
- Albrektsson, T., & Wennerberg, A. (2004). Oral implant surfaces: Part 1—Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *The International journal of prosthodontics*, 17, 536-543.
- Aponte, O. F. G., Díaz, B. M. V., & Huertas, C. E. M. (2015). Quality by design: Principles and opportunities for the pharmaceutical industry. *Estudios Gerenciales*, 31(134), 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.estger.2014.09.005>
- Arkel, E. R. A. V., Surgeon, O., & Boer, H. H. D. (2002). Survival analysis of human meniscal transplantations Patients and Methods. *J Bone Joint Surg [Br]*, 84B(2), 227-231. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.84B2.12443>
- Ashworth, J. C., Mehr, M., Buxton, P. G., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2018). Optimising collagen scaffold architecture for enhanced periodontal ligament fibroblast migration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(11), 166. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6175-9>
- ASTM International. (2014). *ASTM D638—14 Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics*.
- ASTM International. (2017). *ASTM F3223-17, Standard Guide for Characterization and Assessment of Tissue Engineered Medical Products (TEMPs) for Knee*

Meniscus Surgical Repair and/or Reconstruction. ASTM International.

Baek, J., Sovani, S., Glembotski, N. E., Du, J., Jin, S., Grogan, S. P., & D'Lima, D. D. (2016). Repair of Avascular Meniscus Tears with Electrospun Collagen Scaffolds Seeded with Human Cells. *Tissue Engineering - Part A*, 22(5-6), 436-448. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2015.0284>

Bahraminasab, M., & Farahmand, F. (2017). State of the art review on design and manufacture of hybrid biomedical materials: Hip and knee prostheses. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 231(9), 785-813. <https://doi.org/10.1177/0954411917705911>

Baker, S. C., Rohman, G., Hinley, J., Stahlschmidt, J., Cameron, N. R., & Southgate, J. (2011). Cellular Integration and Vascularisation Promoted by a Resorbable, Particulate-Leached, Cross-Linked Poly(ϵ -caprolactone) Scaffold. *Macromolecular Bioscience*, 11(5), 618-627. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000415>

Baynat, C., Andro, C., Vincent, J. P., Schiele, P., Buisson, P., Dubrana, F., & Gunepin, F. X. (2014). Actifit synthetic meniscal substitute: Experience with 18 patients in Brest, France. *Orthopaedics and Traumatology: Surgery and Research*, 100(8), S385-S389. <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2014.09.007>

Bi, L., Cao, Z., Hu, Y., Song, Y., Yu, L., Yang, B., Mu, J., Huang, Z., & Han, Y. (2011). Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(1), 51-62. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4177-3>

Blogg, K. (2013). *The Selection and Application of Design Methodologies for the Design of Bone Tissue Scaffolds* [Cranfield University]. <https://doi.org/10.1260/0957456042880200>

Brelín, A. M., & Rue, J. P. H. (2016). Return to Play Following Meniscus Surgery. *Clinics in Sports Medicine*, 35(4), 669-678. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2016.05.010>

Bryceland, J. K., Powell, A. J., & Nunn, T. (2017). Knee Menisci. *Cartilage*, 8(2), 99-104. <https://doi.org/10.1177/1947603516654945>

Butler, M. F., Ng, Y. F., & Pudney, P. D. A. (2003). Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 41(24), 3941-3953. <https://doi.org/10.1002/pola.10960>

Cai, S., Wu, C., Yang, W., Liang, W., Yu, H., & Liu, L. (2020). Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors. *Nanotechnology Reviews*, 9(1), 971-989. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2020-0076>

Chen, S., Fu, P., Wu, H., & Pei, M. (2017). Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: A comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2613-0>

Chiari, C., Koller, U., Dorotka, R., Eder, C., Plasenzotti, R., Lang, S., Ambrosio, L., Tognana, E., Kon, E., Salter, D., & Nehrer, S. (2006). A tissue engineering approach to meniscus regeneration in a sheep model. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(10), 1056-1065. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.04.007>

Chivers, M. D., & Howitt, S. D. (2009). Anatomy and physical examination of the knee menisci: A narrative review of the orthopedic literature. *The Journal of the Canadian Chiropractic Association*, 53(4), 319-333.

Cui, Y., Cao, Y., Shang, Q., Cui, L., & Liu, W. (2002). [Repair of meniscal defects with autologous tissue-engineered fibrocartilage]. *Zhonghua yi xue za zhi*, 82(3), 191-193.

Dangelmajer, S., Familiari, F., Simonetta, R., Kaymakoglu, M., & Huri, G. (2017). Meniscal Transplants and Scaffolds: A Systematic Review of the Literature. *Knee surgery & related research*, 29(1), 3-10. <https://doi.org/10.5792/ksrr.16.059>

de Groot, J. H. (2005). Polyurethane scaffolds for meniscal tissue regeneration. *Medical Device Technology*, 16(7), 18-20.

Dominici, M., Blanc, K. L., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

Eli, N., Oragui, E., & Khan, W. (2011). Advances in meniscal tissue engineering. *Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja*, 13(4), 319-326. <https://doi.org/10.1155/2012/420346>

Espinosa, Lady, Sosnik, A., & Fontanilla, M. R. (2010). Development and preclinical evaluation of acellular collagen scaffolding and autologous artificial connective tissue in the regeneration of oral mucosa wounds. *Tissue engineering. Part A*, 16(5), 1667-1679. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2008.0571>

Fujii, M., Furumatsu, T., Yokoyama, Y., Kanazawa, T., Kajiki, Y., Abe, N., & Ozaki, T. (2013). Chondromodulin-I derived from the inner meniscus prevents endothelial cell proliferation. *Journal of Orthopaedic Research*, 31(4), 538-543. <https://doi.org/10.1002/jor.22257>

Grassi, A., Zaffagnini, S., Muccioli, G. M. M., Benzi, A., & Marcacci, M. (2014). Clinical outcomes and complications of a collagen meniscus implant: A systematic review. *International Orthopaedics*, 38(9), 1945-1953. <https://doi.org/10.1007/s00264-014-2408-9>

Grier, W. K., Iyoha, E. M., & Harley, B. A. C. (2017). The influence of pore size and stiffness on tenocyte bioactivity and transcriptomic stability in collagen-GAG scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 65, 295-305. PubMed. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.08.034>

Gruber, H. E., Mauerhan, D., Chow, Y., Ingram, J. A., Norton, H. J., Hanley, E. N., & Sun, Y. (2008). Three-dimensional culture of human meniscal cells: Extracellular matrix and proteoglycan production. *BMC Biotechnology*, 8, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-54>

H. Vallejo, A. y B., B. ., Cortés, C. ., Espinosa. (2004). Aplicación de la metodología del diseño axiomático en el desarrollo de productos de liberación modificada. *Revista Ingeniería e Investigación*, 24(3), 41-48.

Hahn TR, Almog J, A. M., Cohen Y. (2004). Genipin a novel fingerprint reagent with colorimetric and fluorogenic activity. *J Forensic Sci.*, Mar 49(2), 255-257.

Han, L., Zhang, Z., Wang, B., & Wen, Z. (2017). Construction and biocompatibility of a thin type I/II collagen composite scaffold. *Cell and Tissue Banking*. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9653-2>

Irawan, V., Sung, T. C., Higuchi, A., & Ikoma, T. (2018). Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15(6), 673-697.

<https://doi.org/10.1007/s13770-018-0135-9>

ISO. (2009). *The International Organization for Standardization 10993-5. Biological evaluation of medical devices part 5: Test for in vitro cytotoxicity.*

Jeffrey A. Weiss Zitnay Jared, R. D. B., Shawn P. Reese, Garvin Tran, Niloofar Farhang. (2018). Fabrication of Dense Anisotropic Collagen Scaffolds using Biaxial Compression. *Acta Biomaterialia*, 65, 76-87.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.017>

Kagan, H. M., & Trackman, P. C. (1991). Properties and function of lysyl oxidase. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 5(3), 206-210. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/5.3.206>

Kang, S. W., Son, S. M., Lee, J. S., Lee, E. S., Lee, K. Y., Park, S. G., Park, J. H., & Kim, B. S. (2006). Regeneration of whole meniscus using meniscal cells and polymer scaffolds in a rabbit total meniscectomy model. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 77(4), 659-671. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30579>

Kean, C. O., Brown, R. J., & Chapman, J. (2017). The role of biomaterials in the treatment of meniscal tears. *PeerJ*, 2017(11). <https://doi.org/10.7717/peerj.4076>

Klatt, A. R., Paul-Klausch, B., Klinger, C., Kühn, C., Renno, J. H., Banerjee, M., Malchau, G., & Wielckens, K. (2009). A critical role for collagen II in cartilage matrix degradation: Collagen II induces pro-inflammatory cytokines and MMPs in primary human chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(1), 65-70. <https://doi.org/10.1002/jor.20716>

Kon, E., Filardo, G., Tschon, M., Fini, M., Giavaresi, G., Reggiani, L. M., Chiari, C., Nehrer, S., Martin, I., Salter, D. M., Ambrosio, L., & Marcacci, M. (2012). Tissue engineering for total meniscal substitution: Animal study in sheep model-results at 12 months. *Tissue Engineering - Part A*, 18(15-16), 1573-1582. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0572>

Kremer, A., Ribitsch, I., Reboredo, J., Dürr, J., Egerbacher, M., Jenner, F., & Walles, H. (2017). Three-Dimensional Coculture of Meniscal Cells and Mesenchymal Stem Cells in Collagen Type I Hydrogel on a Small Intestinal Matrix—A Pilot Study Toward Equine Meniscus Tissue Engineering. *Tissue Engineering - Part A*, 23(9-10), 390-402. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0317>

Laun, M., Auhl, D., Brummer, R., Dijkstra, D. J., Gabriel, C., Mangnus, M. A., Rüllmann, M., Zoetelief, W., & Handge, U. A. (2014). Guidelines for checking performance and verifying accuracy of rotational rheometers: Viscosity measurements in steady and oscillatory shear (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 86(12). <https://doi.org/10.1515/pac-2013-0601>

Lee, B.-S., Kim, H.-J., Lee, C.-R., Bin, S.-I., Lee, D.-H., Kim, N.-J., & Kim, C.-W. (2017). Clinical Outcomes of Meniscal Allograft Transplantation With or Without Other Procedures: A Systematic Review and Meta-analysis. *The American Journal of Sports Medicine*, 036354651772696. <https://doi.org/10.1177/0363546517726963>

Levental, I., Georges, P. C., & Janmey, P. A. (2007). Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter*, 3(3), 299-306. <https://doi.org/10.1039/B610522J>

Li, F., & Qixin Chen Zhao, C. L. (2018). Genipin-cross-linked type II collagen scaffold promotes the differentiation of adipose-derived stem cells into nucleus pulposus-like cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(5), 1258-1268. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36325>

Li, M., Xi, N., Wang, Y., & Liu, L. (2019). Nanotopographical Surfaces for Regulating Cellular Mechanical Behaviors Investigated by Atomic Force Microscopy. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 5(10), 5036-5050. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00991>

Liang, Y., Idrees, E., Szojka, A. R. A., Andrews, S. H. J., Kunze, M., Mulet-Sierra, A., Jomha, N. M., & Adesida, A. B. (2018). Chondrogenic differentiation of synovial fluid mesenchymal stem cells on human meniscus-derived decellularized matrix requires exogenous growth factors. *Acta Biomaterialia*, 80, 131-143. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.038>

Liaw, B.-S., Xing, F., Wang, D., Gao, F., Lu, J., Yu, J., Sun, X., Wang, X., Feng, Q., Zhang, G., & Zhao, L. (2019). Effect of in vitro collagen fibrillogenesis on Langmuir-Blodgett (LB) deposition for cellular behavior regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 179, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.053>

Linder-Ganz, E., Elsner, J. J., Danino, A., Guilak, F., & Shterling, A. (2010). A novel quantitative approach for evaluating contact mechanics of meniscal replacements. *Journal of Biomechanical Engineering*, 132(2), 1-6. <https://doi.org/10.1115/1.4000407>

Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6), 485-502. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437>

Longo, U. G., Loppini, M., Forriol, F., Romeo, G., Maffulli, N., & Denaro, V. (2012). Advances in meniscal tissue engineering. *Stem Cells International*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/420346>

Lutzweiler, G., Halili, A. N., & Vrana, N. E. (2020). The overview of porous, bioactive scaffolds as instructive biomaterials for tissue regeneration and their clinical translation. *Pharmaceutics*, 12(7), 1-29. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070602>

Madaghiele, M., Sannino, A., Yannas, I. V., & Spector, M. (2008). Collagen-based matrices with axially oriented pores. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85A(3), 757-767. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31517>

Maffulli, N., Longo, U. G., Campi, S., & Denaro, V. (2010). Meniscal tears. *Open access journal of sports medicine*, 1, 45-54.

Mandal, B. B., Park, S.-H., Gil, E. S., & Kaplan, D. L. (2011). Multilayered silk scaffolds for meniscus tissue engineering. *Biomaterials*, 32(2), 639-651. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.115>

Markes, A. R., Hodax, J. D., & Ma, C. B. (2020). Meniscus Form and Function. *Clinics in Sports Medicine*, 39(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2019.08.007>

McKeon, B. P., Zaslav, K. R., Alfred, R. H., Alley, R. M., Edelson, R. H., Gersoff, W. K., Greenleaf, J. E., & Kaeding, C. C. (2020). Preliminary Results From a US Clinical Trial of a Novel Synthetic Polymer Meniscal Implant. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 8(9), 1-10. <https://doi.org/10.1177/2325967120952414>

Medicine, I. S. (2012). *CMI Life is Movement!* (p. 6). Ivy Sports Medicine GmbH.

Mi, F. L., Tan, Y. C., Liang, H. C., Huang, R. N., & Sung, H. W. (2001). In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 12(8), 835-850. <https://doi.org/10.1163/156856201753113051>

Mickiewicz, P., Binkowski, M., Bursig, H., & Wróbel, Z. (2014). Preservation and

sterilization methods of the meniscal allografts: Literature review. *Cell and Tissue Banking*, 15(3), 307-317. <https://doi.org/10.1007/s10561-013-9396-7>

Moldovan, L. (2014). QFD Employment for a New Product Design in a Mineral Water Company. *Procedia Technology*, 12, 462-468. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2013.12.515>

Monk, P., Roberts, P. G., Palmer, A. J. R., Bayliss, L., Mafi, R., Beard, D., Hopewell, S., & Price, A. (2016). The Urgent Need for Evidence in Arthroscopic Meniscal Surgery: A Systematic Review of the Evidence for Operative Management of Meniscal Tears. *The American Journal of Sports Medicine*, 0363546516650180. <https://doi.org/10.1177/0363546516650180>

Monllau, J. C., Gelber, P. E., Abat, F., Pelfort, X., Abad, R., Hinarejos, P., & Tey, M. (2011). Outcome after partial medial meniscus substitution with the collagen meniscal implant at a minimum of 10 years' follow-up. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 27(7), 933-943. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2011.02.018>

Moran, C. J., Withers, D. P., Kurzweil, P. R., & Verdonk, P. C. (2015). Clinical Application of Scaffolds for Partial Meniscus Replacement. *Sports medicine and arthroscopy review*, 23(3), 156-161. <https://doi.org/10.1097/JSA.0000000000000072>

Moutos, F. T., & Guilak, F. (2010). Functional properties of cell-seeded three-dimensionally woven poly(epsilon-caprolactone) scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue engineering. Part A*, 16(4), 1291-1301. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0480>

Mozafari, M., Sefat, F., & Atala, A. (2019). Handbook of tissue engineering scaffolds: Volume one. En *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-00858-3>

Mu, C., Zhang, K., Lin, W., & Li, D. (2013). Ring-opening polymerization of genipin and its long-range crosslinking effect on collagen hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 101 A(2), 385-393. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34338>

Mueller, S. M., Shortkroff, S., Schneider, T. O., Breinan, H. A., Yannas, I. V., & Spector, M. (1999). Meniscus cells seeded in type I and type II collagen-GAG matrices in vitro. *Biomaterials*, 20(8), 701-709. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00189-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00189-6)

Murphy, C. M., & O'Brien, F. J. (2010). Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion and Migration*, 4(3), 377-381. <https://doi.org/10.4161/cam.4.3.11747>

Mutsaerts, E. L. A. R., Eck, C. F. van, Graaf, V. A. van de, Doornberg, J. N., & Bekerom, M. P. J. van den. (2016). Surgical interventions for meniscal tears: A closer look at the evidence. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 136(3), 361-370. <https://doi.org/10.1007/s00402-015-2351-2>

Nair, M., Johal, R. K., Hamaia, S. W., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2020). Tunable bioactivity and mechanics of collagen-based tissue engineering constructs: A comparison of EDC-NHS, genipin and TG2 crosslinkers. *Biomaterials*, 254(May), 120109. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120109>

Niemczyk-Soczynska, B., Gradys, A., & Sajkiewicz, P. (2020). Hydrophilic surface functionalization of electrospun nanofibrous scaffolds in tissue engineering. *Polymers*, 12(11), 1-20. <https://doi.org/10.3390/polym12112636>

Ortega, F. R., Rodríguez, G., Aguilar, M. R., García-Sanmartín, J., Martínez, A., & Román, J. S. (2012). Comportamiento reológico de geles biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa. *Biomecánica*, 20(1). <https://doi.org/10.5821/sibb.v20i1.4664>

Oryan, A., Kamali, A., Moshiri, A., Baharvand, H., & Daemi, H. (2018). Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(PartA), 678-688. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184>

Panitch, A., & Julie C. Liu Nelda Vázquez-Portalatín, C. E. K. (2016). Characterization of Collagen Type I and II Blended Hydrogels for Articular Cartilage Tissue Engineering Nelda. *Biomacromolecules*, 10(17), 3145-3152. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00684>

Park, S., & Im, G. (2014). *Review Article Stem cell responses to nanotopography. March*, 1-8. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35236>

Petri, M., Ufer, K., Toma, I., Becher, C., Liodakis, E., Brand, S., Haas, P., Liu, C., Richter, B., Haasper, C., Lewinski, G. von, & Jagodzinski, M. (2012). Effects of perfusion and cyclic compression on in vitro tissue engineered meniscus implants. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 20(2), 223-231. <https://doi.org/10.1007/s00167-011-1600-3>

Philippe Beaufils & René Verdonk. (2010). *The Meniscus* (1.^a ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Puetzer, J. L., & Bonassar, L. J. (2013). High density type i collagen gels for tissue engineering of whole menisci. *Acta Biomaterialia*, 9(8), 7787-7795. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.05.002>

Resmi, R., Parvathy, J., John, A., & Joseph, R. (2020). Injectable self-crosslinking hydrogels for meniscal repair: A study with oxidized alginate and gelatin. *Carbohydrate Polymers*, 234(November 2019), 115902. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115902>

Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(1), 1-19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>

Rodríguez, M. I. A., Barroso, L. G. R., & Sánchez, M. L. (2018). Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 17(1), 20-26. <https://doi.org/10.1111/jocd.12450>

Romero, M. M. G., Aguilera, L. C., & Santander, J. M. P. (2014). *Síntesis y estudios de caracterización preliminares de nuevos materiales Sonogel modificados con Nanocarbon*. Universidad de Cádiz.

Samar, M. E., Ávila, R. E., Asis, O. G., Fonseca, I., & Corball, A. (2012). Identificación de Colágeno I y III con Picrosirius Red/ Polarización en el Estroma de Tumores Salivales. *International journal of odontostomatology*, 6(1), 59-64. <https://doi.org/10.4067/s0718-381x2012000100008>

Sanchez-Adams, J., Wilusz, R. E., & Guilak, F. (2013). Atomic force microscopy reveals regional variations in the micromechanical properties of the pericellular and extracellular matrices of the meniscus. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 31(8), 1218-1225. <https://doi.org/10.1002/jor.22362>

Sorushanova, A., Delgado, L. M., Wu, Z., Shologu, N., Kshirsagar, A., Raghunath,

R., Mullen, A. M., Bayon, Y., Pandit, A., Raghunath, M., & Zeugolis, D. I. (2019). The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Advanced Materials*, 31(1), 1-39. <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>

Soto, E. H. (2014). *Estandarización de un método de purificación de colágeno tipo II y elaboración de soportes para ingeniería de tejido cartilaginoso*. 77.

Stone, K. R., Rodkey, W. G., Webber, R., McKinney, L., & Steadman, J. R. (1992). Meniscal regeneration with copolymeric collagen scaffolds: In vitro and in vivo studies evaluated clinically, histologically, and biochemically. *The American Journal of Sports Medicine*, 20(2), 104-111. <https://doi.org/10.1177/036354659202000202>

Stone, K. R., Steadman, J. R., Rodkey, W. G., & Li, S. T. (1997). Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold. Analysis of preliminary data. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 79(12), 1770-1777.

Stone, R. B., & Wood, K. L. (1999). Development of a Functional Basis for Design. *Journal of Mechanical Design*, 122(4), 359-370. <https://doi.org/10.1115/1.1289637>

Stylianou, A. (2017). Atomic force microscopy for collagen-based nanobiomaterials. *Journal of Nanomaterials*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9234627>

Suesca, E. B. (2013). *Optimización de la obtención de soportes de colágeno y estudio del efecto de su microestructura en el desarrollo de mucosa oral artificial*. Universidad Nacional de Colombia.

Suesca, E., Dias, A. M. A., Braga, M. E. M., Sousa, H. C. de, & Fontanilla, M. R. (2017). Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, 77, 333-341. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.243>

Sun, J., Vijayavenkataraman, S., & Liu, H. (2017). An overview of scaffold design and fabrication technology for engineered knee meniscus. *Materials*, 10(1), 1-19. <https://doi.org/10.3390/ma10010029>

Tamaddon, M., Burrows, M., Ferreira, S. A., Dazzi, F., Apperley, J. F., Bradshaw, A., Brand, D. D., Czernuszka, J., & Gentleman, E. (2017). Monomeric, porous type II collagen scaffolds promote chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Scientific Reports*, 7(January), 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep43519>

Thorlund, J. B., Hare, K. B., & Lohmander, L. S. (2014). Large increase in arthroscopic meniscus surgery in the middle-aged and older population in Denmark from 2000 to 2011. *Acta Orthopaedica*, 85(3), 287-292. <https://doi.org/10.3109/17453674.2014.919558>

Verdonk, R., Verdonk, P., Huysse, W., Forsyth, R., & Heinrichs, E.-L. (2011). Tissue Ingrowth After Implantation of a Novel, Biodegradable Polyurethane Scaffold for Treatment of Partial Meniscal Lesions. *The American Journal of Sports Medicine*, 39(4), 774-782. <https://doi.org/10.1177/0363546511398040>

Yan, L. P., Oliveira, J. M., Oliveira, A. L., Caridade, S. G., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2012). Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 8(1), 289-301. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.09.037>

Zaffagnini, S., Muccioli, G. M. M., Lopomo, N., Bruni, D., Giordano, G., Ravazzolo, G., Molinari, M., & Marcacci, M. (2011). Prospective long-term outcomes of the medial collagen meniscus implant versus partial medial meniscectomy: A minimum

10-year follow-up study. *American Journal of Sports Medicine*, 39(5), 977-985.
<https://doi.org/10.1177/0363546510391179>