

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE GLUCOSA, MALTOSA Y
TREHALOSA COMO AGENTES
CRIOFIJADORES DE TEJIDOS ARTIFICIALES
OBTENIDOS POR INGENIERÍA TISULAR**

TESIS DOCTORAL

Deyanira Serrato Ochoa

2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Deyanira Serrato Ochoa
D.L.: GR 3004-2010
ISBN: 978-84-693-2585-8



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Histología

Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular CTS - 115

**“EVALUACIÓN DE GLUCOSA, MALTOSA Y TREHALOSA COMO
AGENTES CRIOFIJADORES DE TEJIDOS ARTIFICIALES OBTENIDOS
POR INGENIERÍA TISULAR”**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada, en el contexto del programa oficial de postgrado Máster y Doctorado en Ingeniería Tisular y fue financiado por el proyecto FIS08/614 del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia y Tecnología del Reino de España).

Granada, 2010.

Memoria que presenta la Licenciada en Odontología
Deyanira Serrato Ochoa
para aspirar al título de Doctor

Fdo.: Deyanira Serrato Ochoa

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Dr. D. Antonio Campos Muñoz
Catedrático de Histología
Universidad de Granada

Fdo.: Dr. D. Miguel Alaminos Mingorance
Profesor Titular de Histología
Universidad de Granada

VºBº El Director de la Tesis

Fdo.: Dr. D^a. María del Carmen Sánchez Quevedo
Catedrática de Histología
Universidad de Granada

Departamento de Histología
Universidad de Granada
2010

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me acompañó en todo momento, manifestando su presencia en todas las personas que nos han brindado su apoyo y afecto desde el primer día que llegamos a España.

Quiero expresar mi más sincera gratitud y admiración al Dr. Antonio Campos, Dr. Miguel Alaminos, Dra. Ma. Del Carmen Sánchez Quevedo, Dr. José Manuel García y al Dr. Vicente Crespo Ferrer, por su ejemplo, constancia y disposición en todo momento para compartir sus conocimientos.

A la Dra. Ingrid Garzón, quien nos inculcó los primeros conocimientos de las técnicas empleadas en el laboratorio, gracias por ser paciente. No sin olvidar a Miguel González Andrades, Dr. Ismael A. Rodríguez, Dra. Inmaculada Cabello y Dra. Amparo Montalvo, por su gran amistad y ejemplo de superación.

Un reconocimiento a todas estas personas que he mencionado, pues convierten el departamento de histología en un segundo hogar. En todo momento alientan los sueños de cumplir nuestras metas profesionales.

A mis Padres, pues a ellos les debo todo lo que soy.

A mi bebecito Mateo, que con su hermosa sonrisa me impulsa a seguir adelante.

A Renato, por estar a mi lado, por su comprensión y apoyo.

A mis hermanas y sobrinitos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
A. <u>LA INGENIERÍA TISULAR</u>	2
1. Terapia Celular	2
2. Ingeniería Tisular	4
3. Regeneración Tisular Guiada.....	5
1.) Células troncales	7
2.) Biomateriales	12
B. <u>TÉCNICAS DE ANÁLISIS HISTOLÓGICO</u>	23
B.1. Obtención.....	24
B.2. Fijación.....	24
B.3 Inclusion.....	28
B.4 Corte.....	32
B.5 Tinción o coloración	34
B.6 Montaje.....	35
C. <u>CRIOPRESERVACIÓN</u>	36
OBJETIVOS.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
A. Elaboración de tejidos orales artificiales basados en biomateriales de fibrina y agarosa obtención.....	42
B. Protocolos de crioprotección para el análisis histológico de los tejidos orales artificiales basados en biomateriales de fibrina y agarosa	43
C. Análisis histológico.....	45
D. Análisis estadístico	49
RESULTADOS	50

A. Generación de tejidos orales artificiales basados en biomateriales de fibrina y agarosa mediante ingeniería tisular	51
B. Análisis histológico de las muestras control.....	52
C. Análisis histológico de muestras previamente incubadas en agentes químicos.....	54
D. Análisis histológico de muestras preincubadas en distintas concentraciones de glucosa.....	56
E. Análisis histológico de muestras preincubadas en distintas concentraciones de maltosa.....	60
F. Análisis histológico de muestras preincubadas en distintas concentraciones de trehalosa	64
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES.....	82
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

INTRODUCCIÓN

A. LA INGENIERÍA TISULAR

En numerosas ocasiones, distintos tipos de enfermedades de origen infeccioso, genético, degenerativo, o bien un daño físico o químico, pueden dar lugar a una pérdida o alteración de las células de un tejido u órgano. Esta pérdida o daño celular pueden conllevar una alteración de la función normal de dicho tejido u órgano y, por consiguiente, conducir al desarrollo de enfermedades o secuelas físicas que mermen la calidad vital de la persona. Por ese motivo, uno de los principales retos de la medicina actual es conseguir la regeneración *ad integrum* y el restablecimiento de la función normal de dichos tejidos u órganos. Estos dos objetivos, **regeneración** y **restablecimiento** de la función normal de un tejido u órgano dañado, son los fines principales de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa (Fodor, 2003). Para lograr estos fines, se pueden utilizar tres tipos de técnicas:

1. **Terapia Celular**. Consiste en la implantación de agregados celulares en el tejido dañado para lograr la reparación del mismo. Estos agregados se pueden generar mediante cultivos *ex vivo*, los cuales pueden proceder del propio paciente (células autogénicas o autólogas) (Brittberg *et al.*, 1994; Pelligrini *et al.*, 1999), de una persona distinta (células alogénicas o heterólogas) (Ryan *et al.*, 2001; Penn *et al.*, 2002) y, en última instancia, de un donante de distinta especie (células xenogénicas o xenólogas) (Matsumura *et al.*, 1987; Fink *et al.*, 2000). En sentido amplio, esta estrategia terapéutica incluye cualquier tipo de tratamiento que utilice células como agente terapéutico como, por ejemplo, las transfusiones sanguíneas o el trasplante de médula ósea (Figura 1).

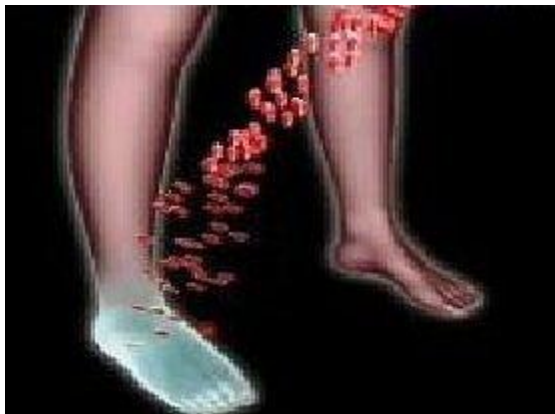
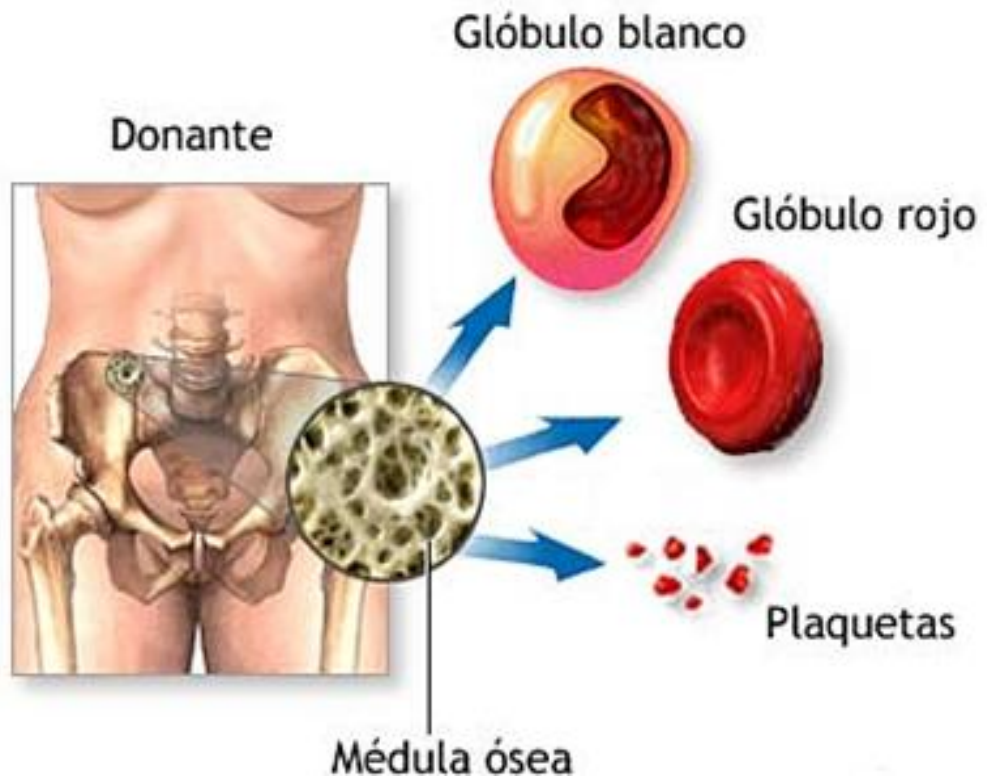


Figura 1. Imagen ilustrativa del procedimiento mediante el cual las células madre adultas se extraen de la médula ósea de un paciente y posteriormente se inyectan a nivel de la extremidad afectada para inducir su regeneración.

2. Ingeniería Tisular. La ingeniería tisular se puede definir como la construcción de tejidos biológicos artificiales y su utilización terapéutica para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos (Campos, 2004; Gómez de Ferraris y Campos, 2009). De hecho, la construcción de órganos y tejidos artificiales por *ingeniería tisular* es uno de los campos de investigación que ha experimentado mayor progreso durante los últimos años. Las aplicaciones de la ingeniería tisular en el campo de la *medicina* abren nuevas alternativas de tratamiento para pacientes con diferentes tipos de patologías, lesiones tisulares u orgánicas, u otros problemas clínicos. En este contexto, la ingeniería tisular permite generar diferentes tipos de substitutos biológicos útiles para la regeneración y el mantenimiento de la función normal de los tejidos enfermos y dañados. Así, las técnicas de ingeniería tisular permiten sustituir el tejido dañado por otro tejido nuevo que haya sido fabricado en el laboratorio mediante técnicas de ingeniería tisular (Langer y Vacanti, 1993). Básicamente, la ingeniería tisular consiste en cultivar células en una matriz artificial tridimensional, donde estas células pueden crecer, y así, posteriormente, el tejido artificial desarrollado se trasplanta a un órgano receptor (Figura 2). La utilidad terapéutica de este tipo de técnicas es prácticamente ilimitada, con aplicaciones en todos los campos. Hoy en día, la ingeniería tisular está enfocada hacia la generación en laboratorio de la mayoría de los tejidos que existen en el ser humano, habiendo alcanzado buenos resultados en el caso del cartílago, hueso, piel, mucosa oral, córnea, válvulas de corazón, nervio, vejiga, etc. (Meana *et al.*, 2006; Llames *et al.*, 2006; González-Andrades *et al.*, 2009; Garzón *et al.*, 2009; Sundelacruz *et al.*, 2009; Alaminos *et al.*, 2006,2007; Terenghi *et al.*, 2009; Christ *et al.*, 2007).

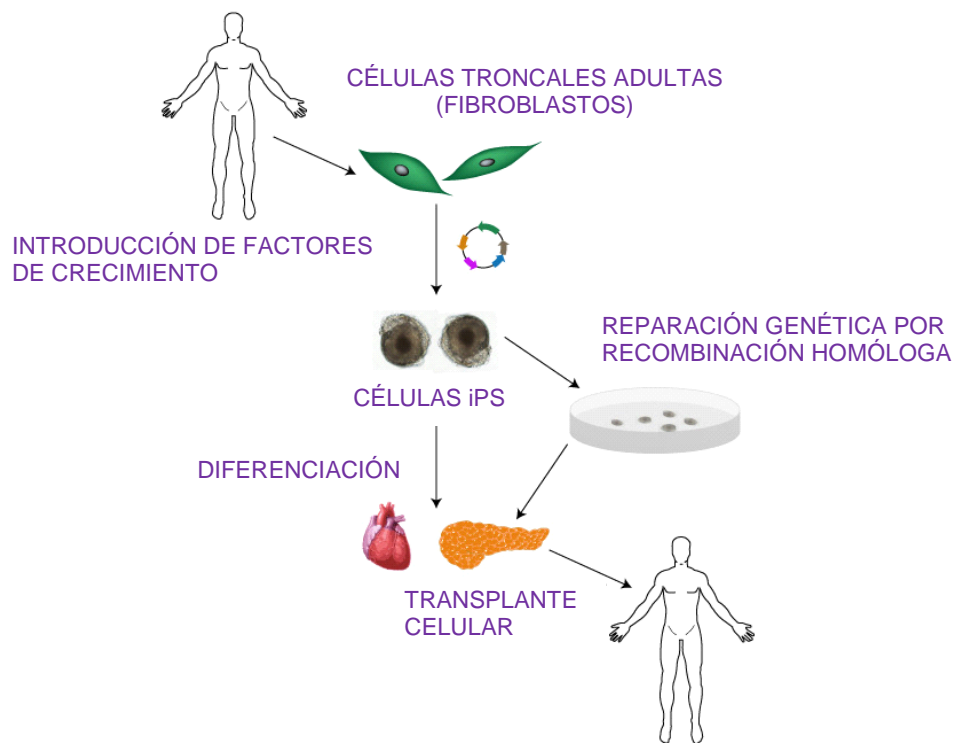


Figura 2. Ejemplo de un método de ingeniería tisular en el que los fibroblastos adultos humanos son inducidos hacia una estirpe pluripotencial indiferenciada mediante modificación genética y factores de crecimiento para generar tejidos artificiales de uso clínico.

3. Regeneración tisular guiada. En ocasiones, se puede regenerar el tejido *in situ* mediante la estimulación del crecimiento de las células del propio tejido dañado utilizando fármacos, biomateriales, factores de crecimiento o mediante terapia génica (Androutsellis-Theotokis *et al.*, 2006) (Figura 3).



Figura 3. Ejemplo de un método utilizado para la regeneración tisular guiada en odontología. Membrana hidrofílica de ácido poliláctico. Permite el paso del flujo sanguíneo y una adherencia a la superficie dental. Con ella se consigue una regeneración ósea guiada.

Por otra parte, existen numerosas ventajas asociadas a la utilización de células o tejidos autólogos en el contexto de la ingeniería tisular, destacando sobre todo las siguientes:

-Reducción significativa del número de *infecciones transmitidas desde un donante hacia un receptor* por agentes infecciosos como el citomegalovirus, virus del Epstein–Barr, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B o virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (McDevitt., 2006; Bingler *et al.*, 2008; Singer *et al.*, 2008), entre otros, puesto que en la mayoría de los casos se utilizan células de origen autólogo.

-Ausencia de *rechazo inmune* frente al tejido implantado en aquellos casos en los que el tejido artificial sea de origen autólogo (Fodor, 2003), por lo que el paciente no tendría necesidad de tomar tratamiento inmunosupresor y, así, se evitarían los efectos secundarios de estas drogas (neutropenia, anemia, neuropatías tóxicas, diabetes secundaria, etc.) y los problemas añadidos que

presentan los pacientes inmunodeprimidos, como las infecciones secundarias a la neutropenia (Smith *et al.*, 2003; Teraoka *et al.*, 2005; Kamoun, 2006).

-Reducción de las *listas de espera*, con lo que se disminuiría la morbi-mortalidad de la enfermedad en el receptor (Fryer, 2008).

-Reducción de la *morbilidad-mortalidad* en los donantes de órganos (Yeh and Olthoff, 2008).

En la mayoría de los casos, la ingeniería tisular se basa fundamentalmente en tres elementos:

- Células, las cuales deben presentar capacidad de proliferación y crecimiento en cultivo, especialmente las células ***madre, troncales o estaminales***.
- Biomateriales, los cuales se utilizan como andamios que permiten el desarrollo de un tejido tridimensional.
- Factores de crecimiento, que se utilizan para inducir el desarrollo y la diferenciación celular dentro del tejido artificial.

Por su gran interés para la generación de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular, a continuación trataremos brevemente los dos primeros:

1.)Células troncales

Una célula madre o troncal es aquella que tiene capacidad para llevar a cabo la división asimétrica. Estas células tienen gran potencial para dividirse y diferenciarse en distintos tipos de células más especializadas (Smith, 2006), no sólo morfológicamente si no también a nivel funcional.

Las células madre **se pueden clasificar** de distintas formas:

a) Atendiendo a su **potencialidad** (Smith, 2006), es decir, a su capacidad para diferenciarse en distintos tipos celulares:

a.1) **Totipotenciales**: Son aquéllas capaces de diferenciarse tanto en tejido embrionario (por ejemplo: sistema nervioso, músculo, etc.) como en tejido extraembrionario (placenta y anejos placentarios). En sentido estricto, solamente los estadios iniciales del desarrollo (zigoto, blastómeras y células de la mórula) constituirían células madre totipotenciales (Figura 4).

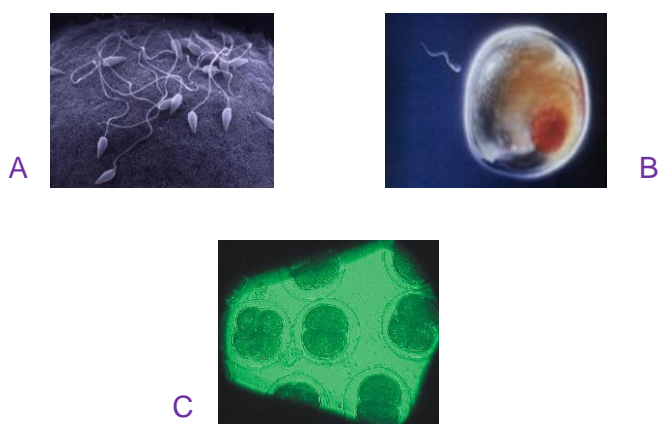


Figura 4. Primeras fases del desarrollo embrionario humano. A) Espermatozoides sobre un ovocito. B) Un espermatozoide en el momento de la fecundación del ovocito. El ovocito fertilizado se denomina *zigoto*. C) El huevo fertilizado se divide primero en dos células (blastómeras) y después en cuatro células. El embrión continuará dividiéndose hasta que forme la *mórula*. Las células hasta esta etapa son *células troncales totipotenciales* (células troncales embrionarias tempranas).

a.2) Pluripotenciales: Son aquéllas que tienen la capacidad de diferenciarse a cualquiera de los tejidos existentes en un organismo adulto, y por tanto, a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo), incluyendo las células germinales. Las células pluripotenciales son las del polo embrionario del blastocisto (Figura 5).



Figura 5. Embrión en fase de blastocisto. En un momento dado, la proliferación asimétrica de las células de la mórula provoca la formación de una cavidad interna denominada blastocele. Las células de la masa celular interna presentan carácter pluripotencial.

- a.3) Multipotenciales: Serían capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares, pero siempre restringiendo su potencialidad a tejidos derivados de una misma capa embrionaria, es decir, tejidos derivados del ectodermo, mesodermo o endodermo. Las células troncales de la placenta y células troncales adultas son multipotentes, destacando, por ejemplo, las de la médula ósea (Figura 6).

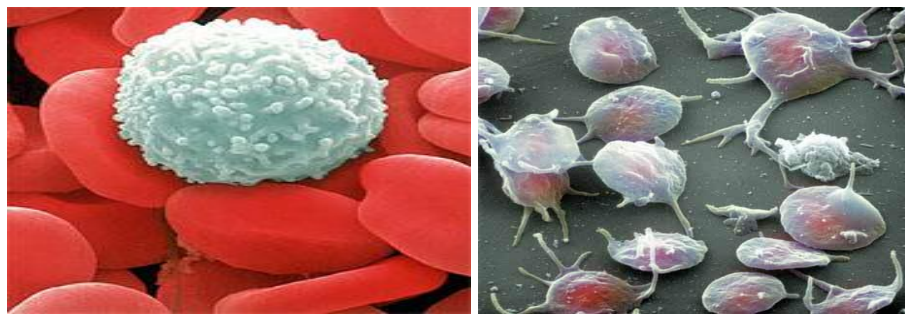


Figura 6. Las células troncales de la médula ósea, pueden diferenciarse a eritrocitos, leucocitos o plaquetas.

- a.4) Unipotenciales: Capacidad para formar un único linaje celular. Por ejemplo: células madre epiteliales de la capa basal de la epidermis (Figura 7).

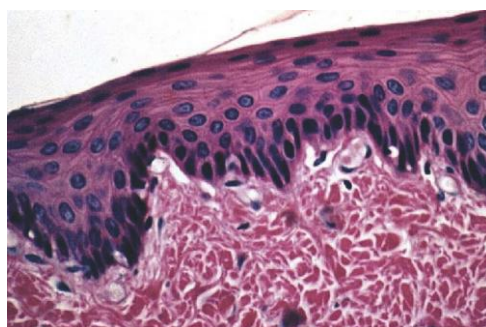


Figura 7. Imagen histológica de la piel humana normal. La capa basal de la epidermis está formada por una hilera de células que regeneran constantemente la epidermis. En esta capa se encuentran melanocitos, queratinocitos, células de Merkel, células de Langerhans y otros tipos celulares.

b.) ***Según su origen***, las células madre se pueden clasificar en:

- b.1) **Embrionarias**: Existen únicamente durante el periodo embrionario. Se pueden obtener a partir de la masa celular interna del blastocisto en el estadio de embrión preimplantatorio (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998), o bien, de la cresta gonadal (Matsui *et al.*, 1991; Resnick *et al.*, 1992; Shablott *et al.*, 1998). Las células madre embrionarias de la masa celular interna del blastocisto son pluripotenciales, es decir, son capaces de diferenciarse a cualquier tejido del organismo, incluyendo tejidos somáticos (corazón, hígado, etc.) y germinales (ovocitos y espermatozoides) (Geijsen *et al.*, 2004)
- b.2) **Adultas**: Existen en el adulto, el feto y el cordón umbilical. Tienen capacidad proliferativa y un potencial de diferenciación menores que las células madre embrionarias. Son células multipotenciales o unipotenciales, y se han podido identificar en casi todos los tejidos del organismo (Raff, 2003).

2.) Biomateriales

La **matriz extracelular nativa de un tejido (MEC)** es una estructura compleja que está diseñada para satisfacer las necesidades específicas de ese tejido, fundamentalmente las necesidades de tipo físico y biomecánico. En la mayoría de los casos, la matriz extracelular es un componente restringido al tejido conectivo, el cual consta de células embebidas en una abundante matriz extracelular sintetizada por ellas mismas, siendo muy escasa o inexistente en tejidos como el epitelial (Ross and Pawlina, 2007).

En el tejido conjuntivo, la matriz extracelular, es una red estructural compleja e intrincada que rodea y sostiene las células del tejido conjuntivo. La matriz extracelular contiene una variedad de fibras, como las **fibras colágenas** y **elásticas**, que están compuestas por tipos diferentes de proteínas estructurales. Además, esta matriz contiene varios **proteoglucanos** (por ejemplo, agrecano, sindecano), **glucoproteínas multiadhesivas** (como la fibronectina y la laminina) y **glucosaminoglucanos** (por ejemplo, dermatán, sulfato, queratán sulfato, hialuronano). Los tres últimos grupos de moléculas constituyen la **sustancia fundamental**. Todas las moléculas que hay en la matriz extracelular comparten dominios comunes y la función de esta matriz depende mucho de las interacciones entre estas moléculas. Cada célula del tejido conjuntivo secreta una proporción diferente de moléculas de la matriz extracelular que contribuyen a la formación de muchas organizaciones estructurales diferentes; en consecuencia, la matriz posee propiedades mecánicas y bioquímicas características específicas del tejido en el que se encuentra.

La matriz extracelular provee sostén mecánico y estructural al tejido, lo mismo que fuerza tensora. También actúa como una barrera bioquímica y desempeña algún papel en la regulación de las funciones metabólicas de las células que rodea. La matriz fija las células en los tejidos mediante moléculas de adhesión célula-matriz extracelular y provee vías para la migración celular.

Estudios recientes indican que la matriz extracelular ejerce una acción reguladora sobre el desarrollo embrionario y la diferenciación celular. La matriz tiene la capacidad de fijar y retener factores de crecimiento que, a su vez, modulan la proliferación celular. Con la ayuda de moléculas de adhesión celular la matriz también ejerce un efecto sobre la transmisión de información a través de la membrana plasmática de las células del tejido conjuntivo. Así, los componentes de la matriz extracelular forman un sistema dinámico e interactivo que informa a las células sobre los cambios bioquímicos y mecánicos en el medio externo circundante.

La **sustancia fundamental** es una sustancia viscosa, clara y resbaladiza al tacto. Posee un alto contenido de agua y poca estructura morfológica. La sustancia fundamental consiste principalmente en tres grupos de moléculas: **proteoglucanos**, macromoléculas muy grandes que poseen una proteína central, **glucosaminoglucanos (GAG)**, que están unidos en forma covalente a los proteoglucanos, y **glucoproteínas multiadhesivas**.

Las células están acopladas mecánicamente en su ambiente extracelular y juegan un papel crucial como mediadoras de respuestas celulares ante una variedad de estímulos (Pedersen and Swartz, 2005).

La generación de tejidos de naturaleza conectiva mediante ingeniería tisular (por ejemplo, de hueso, cartílago, dermis, lámina propia de la mucosa oral, etc.) requiere de la utilización de algún tipo de material que actúe como sustituto de la

matriz extracelular del tejido nativo (Ma *et al.*, 2005). En la mayoría de los casos, se utilizan los denominados biomateriales.

Los **biomateriales** son compuestos de origen natural o sintético, sólidos o líquidos, que se utilizan en dispositivos médicos o en contacto con sistemas biológicos. En general, los biomateriales son sustancias farmacológicamente inertes utilizadas para ser incorporadas o implantadas dentro de un sistema vivo para reemplazar o restaurar alguna función, permaneciendo en contacto permanente o intermitente con fluidos corporales o tejidos humanos. Los biomateriales, como campo de estudio, han experimentado un crecimiento constante en aproximadamente medio siglo de existencia y se utilizan, entre otros, en medicina, biología, química e ingeniería. La generación de nuevos biomateriales para su aplicación en medicina es un proceso multidisciplinar en el que convergen los principios del diseño, de la física, la química, la ingeniería industrial, la ingeniería química, y las ciencias de los materiales (Grodzinski *et al.*, 2006).

La utilización de distintos tipos de biomateriales en biomedicina está cada vez más extendida. En concreto, desde las primeras aplicaciones médicas de las prótesis de madera o metales nobles hace ya más de cinco siglos, hemos pasado a una medicina en la que la utilización de los biomateriales naturales y sintéticos es cada vez mayor, utilizándose a menudo en intervenciones reparadoras del aparato locomotor (rodillas, caderas, etc.), el sistema cardiovascular (válvulas cardíacas, arterias, etc.), el aparato digestivo (esófago, conductos biliares), el sistema genitourinario (uréter, uretra, vejiga), así como en oftalmología, dermatología y cirugía plástica. De igual modo, la aplicación de adhesivos y selladores tisulares basados en polímeros de fibrina o colágeno ha permitido la realización de intervenciones quirúrgicas complejas, especialmente aquellas relacionadas con la extirpación parcial de órganos macizos (riñones, hígado).

Estos polímeros se aplican en forma líquida durante la intervención, induciéndose su polimerización mediante la adición de ciertos compuestos ricos en calcio, en el caso de la fibrina, o en grupos hidroxilo, en el caso del colágeno.

Algunos biomateriales se utilizan para reemplazar o sustituir un fragmento de tejido dañado. Otros, se aplican para generar una serie de fuerzas mecánicas de tensión o resistencia (como las mallas sintéticas que se usan en la reparación de hernias de la pared abdominal). Finalmente, ciertos biomateriales son utilizados como inductores del crecimiento o la reparación de los tejidos del paciente en el cual se implantan (por ejemplo, los materiales osteoinductores).

2.1.- Criterios de calidad de los biomateriales.

En todos los casos, la utilización de cualquier tipo de biomaterial en medicina ha de estar sometida a una serie de estrictos controles que garanticen el cumplimiento de una serie de **indicadores de calidad** que se pueden resumir en los siguientes

requisitos:

- Biocompatibilidad o aceptación por el organismo receptor. Para que un biomaterial pueda ser utilizado en medicina, es necesario que éste sea biocompatible. La biocompatibilidad hace referencia a la capacidad de un material de integrarse en el organismo receptor sin causar daños ni efectos secundarios indeseados.
- Ausencia de toxicidad o efectos secundarios indeseables.
- Ser químicamente estable e inerte.
- Cumplir los requerimientos bio-mecánicos necesarios para llevar a cabo su función en el organismo: Adecuada resistencia mecánica, elasticidad, tiempo de fatiga suficiente, etc.

- Facilidad de producción y procesamiento.
- En el caso de los biomateriales para uso en Ingeniería Tisular, es importante que los mismos sean capaces de permitir el desarrollo, la proliferación y la diferenciación de las células cultivadas en este material (Hutmacher *et al.*, 2001). A través de técnicas de ingeniería tisular diversos investigadores han desarrollado órganos y tejidos artificiales con potencial terapéutico utilizando diversos biomateriales como sustitutos estromales. Estos sustitutos artificiales deben imitar en gran parte, la matriz extracelular de la estructura deseada y la función del órgano a generarse (Li *et al.*, 2002; Boland *et al.*, 2004; Sachlos and Czernuszka, 2003). Deberán además, poseer una adecuada resistencia y soporte (Bruder and Fox, 1999), controlar la liberación de moléculas bioactivas, ser biocompatibles y poseer propiedades biodegradables (Hutmacher *et al.*, 2001). Por otro lado, la forma o arquitectura del biomaterial definirá las características anatómicas del nuevo tejido, sobre todo los de estructura física estable (biomateriales duros). Otros elementos importantes para el éxito del biomaterial utilizado son las proteínas de unión como las integrinas, que juegan un papel crucial en la adhesión, migración y creación de enlaces dinámicos entre los ambientes intra y extracelulares, de la matriz extracelular y las moléculas del citoesqueleto (Yamada *et al.*, 2003; Berrier and Yamada 2007).

Para ello, en la mayoría de los casos, es necesario que el biomaterial pueda adoptar consistencia líquida en un momento dado para, una vez suspendidas las células en este biomaterial líquido, inducir la polimerización o solidificación irreversible para generar un biomaterial de consistencia sólida o semisólida con las células atrapadas en su interior.

2.2.- Tipos de Biomateriales.

Existen distintos tipos de biomateriales fundamentalmente utilizados en **medicina**: los biomateriales **sintéticos** y los biomateriales **biológicos**:

2.2.1. Biomateriales sintéticos. Se denominan sintéticos a aquellos materiales que se producen en laboratorio, generalmente mediante procesos industriales, generalmente una síntesis química que reproduce las características (composición y propiedades) naturales de otros materiales. Los más importantes son los siguientes:

- Los biomateriales de naturaleza **polimérica** o **polímeros** (teflón, nylon, dacron, siliconas, etc.) tienen la ventaja de ser elásticos, presentar baja densidad y ser fáciles de fabricar. Su principal desventaja, sin embargo, es la baja resistencia mecánica y su degradación con el tiempo, así como la dificultad para mantener células en su interior en muchos de los casos. Los polímeros tienen la ventaja de que sus propiedades mecánicas son moldeables, obteniéndose así ciertas características específicas.

Los polímeros son materiales constituidos por grandes moléculas (macromoléculas) formadas por la unión entre sí de moléculas pequeñas llamadas monómeros. La unión de los monómeros puede dar lugar a cadenas lineales, a cadenas ramificadas o a redes. Las distintas formas de asociación de los monómeros participa en la determinación de las propiedades del polímero y, por lo tanto, en su utilidad para diversas aplicaciones. Los principales polímeros empleados en aplicaciones médicas y farmacológicas son: el polietileno de baja densidad LDPE (acrónimo de Low Density Poly Ethylene), el policloruro de vinilo (PVC), el poliestireno (PS), el polietileno de alta densidad HDPE, (acrónimo de High Density Poly Ethylene) en la que los monómeros de etileno están

asociados en forma de cadenas lineales; el polipropileno (PP), los poliésteres termorrígidos, los poliuretanos (PU), los acrílicos, el nylon (poliacetato), epoxis y otros (poliacetales, celulósicos, poliésteres termoplásticos, policarbonatos, polisulfonas, resinas urea-formaldehído).

En lo que se refiere específicamente a la ingeniería tisular, los polímeros más utilizados son aquellos que tienen capacidad para ser biodegradados una vez implantados en el organismo por efecto, sobre todo, de diferentes enzimas existentes en los tejidos humanos (proteasas, polisacaridasas, lipasas, etc.). Entre estos biomateriales sintéticos biodegradables, los más conocidos en ingeniería tisular son el ácido poli-L-láctico (PLLA), el ácido poli-glicólico (PGA), la poli-ε-caprolactona (PCL), y los copolímeros co-poli-LL-GA, co-poli-LL-CA, co-poli-LLA-etilen-glicol y co-poli-fumarato-etilen-glicol. Los andamios de polímeros se utilizan en ingeniería tisular para implantar y anclar tejidos y para promover la integración con el tejido circundante nativo. Estudios recientes han demostrado que imitan la morfología del tejido óseo natural y la mineralización es más rápida (Geffre *et al.*, 2009). En este contexto, se ha sugerido que la nanotopografía, los materiales bio-miméticos y los factores de crecimiento integrados, aceleran el crecimiento interno de las células óseas generadas mediante ingeniería tisular. Por ello, se ha sugerido la posibilidad de desarrollar sustitutos óseos que puedan reparar los defectos de hueso y promover su formación para la aplicación ortopédica (Stevens *et al.*, 2008).

- Los biomateriales **metálicos** o **metales**, como el acero o las aleaciones de titanio, se utilizan con frecuencia en traumatología. Entre los materiales metálicos más utilizados se destacan los aceros inoxidables tipo 316L, las aleaciones de cobalto y cromo, las aleaciones titanio,

aluminio y vanadio y las aleaciones cobalto, níquel, cromo y molibdeno. Sus principales ventajas son la resistencia al impacto y al desgaste y su carácter inerte. Sin embargo, presentan escasa biocompatibilidad y dificultad para su integración con los tejidos conectivos periféricos.

- Los materiales **cerámicos**, como el óxido de aluminio, aluminatos de calcio, óxidos de titanio y algunos carbonos, se utilizan desde hace tiempo en cirugía maxilofacial, odontología y traumatología. Sus ventajas son la buena biocompatibilidad, resistencia a la corrosión e inercia química. Sin embargo, en ocasiones presentan problemas ante esfuerzos de alto impacto, presentan escasa elasticidad y son de difícil producción. Los cerámicos son materiales inorgánicos formados por elementos metálicos y no metálicos unidos principalmente por enlaces iónicos (electrostáticos) y uniones covalentes (electrones compartidos). Los cerámicos suelen tener gran estabilidad química frente al oxígeno, el agua, los medios ácidos, alcalinos y salinos, y los solventes orgánicos. Son muy resistentes al desgaste y generalmente se comportan como buenos aislantes térmicos y eléctricos. Todas estas propiedades son ventajosas para su aplicación como biomateriales. Los materiales cerámicos han adquirido recientemente una gran importancia como candidatos para la fabricación de implantes. Los principales dentro de esta categoría son la alúmina (monocristal de óxido de aluminio), el carbón pirolítico, la hidroxiapatita (fosfato de calcio hidratado) y los vitrocerámicos basados en SiO_2 - CaO - Na_2O - P_2O_5 y algunos en MgO y K_2O .
- Los biomateriales de **nuevo diseño**, como los nanocompuestos o *nanocomposites*, las cerámicas metal-carbono o metal-nitrógeno, y las

alecciones intermetálicas complejas resultan la mayor promesa en cuanto a biocompatibilidad se refiere. Poseen la mayor parte de las ventajas anteriormente mencionadas, siendo actualmente su mayor desventaja la dificultad y el costo de su fabricación, así como la escasa experiencia existente hasta el momento en su utilización clínica.

2.2.2. Biomateriales naturales. Los materiales naturales son aquéllos que se obtienen a partir de productos encontrados en la naturaleza, ya sean de origen mineral, vegetal o animal. Los más utilizados son los biomateriales biológicos, procedentes de la síntesis biológica por parte de un ser vivo. Los biomateriales naturales más conocidos y utilizados hasta el momento son los que se describen a continuación:

- Biomateriales de estructura fibrosa (**fibras**). Se trata de materiales cuyas moléculas se organizan espacialmente para formar estructuras filiformes en las que predomina claramente el eje longitudinal sobre el transversal y el sagital, denominadas fibras. Los biomateriales fibrosos más conocidos son, probablemente, el colágeno y la fibrina.

El colágeno tipo I es un biomaterial fibroso soluble en medios ácidos que es sintetizado fundamentalmente por los fibroblastos y que constituye uno de los principales componentes de la matriz extracelular del tejido conjuntivo. Por este motivo, este biomaterial es perfectamente biocompatible y permite el crecimiento celular tanto en su interior como en su superficie. Los geles de colágeno tipo I, polimerizables mediante la adición de sustancias tampón de pH alto, se han utilizado con gran frecuencia en el campo de la oftalmología, la dermatología y la odontología (Reichl and Muller-Goymann, 2003).

La fibrina es un producto generado a partir del fibrinógeno, componente muy abundante en el plasma sanguíneo y responsable de la generación del coágulo sanguíneo. Por ello, la posibilidad de obtener este producto con carácter autólogo y su biocompatibilidad hacen que este biomaterial se haya utilizado con frecuencia en biomedicina, especialmente, para la generación de piel artificial para uso en dermatología y en cirugía plástica (Meana *et al.*, 1998; Llames *et al.*, 2006). La fibrina humana tiene algunas ventajas, entre otras: coste bajo, asequible y con buena tolerancia por parte de las células.

Dentro de los materiales que se han utilizado para construir substitutos estromales está el colágeno tipo I y la fibrina. El colágeno tipo I se ha utilizado extensivamente como andamio en la ingeniería tisular para la construcción de diversos tejidos, entre otros: piel artificial, mucosa oral y córneas (Meana *et al.*, 1998; Llames *et al.*, 2004; Orwin *et al.*, 2000). Sin embargo, el colágeno es un material costoso y tiende a encoger y a perder el volumen cuando las células se siembran en el andamio (Porter *et al.*, 1998; Tegtmeier *et al.*, 2001). Además, los substitutos estromales hechos de colágeno no siempre son estables y se degradan rápidamente (Chen *et al.*, 2005).

- Biomateriales naturales poliméricos. Los más conocidos son aquéllos que constan de largas cadenas de monómeros de hidratos de carbono como la glucosa. Algunos de ellos son:
 - La agarosa, obtenida a partir de la pared de ciertas algas marinas del grupo *Rhodophyceae*, sobre todo *Gracillaria sp.* y *Gellidium sp.* y utilizada en ingeniería tisular en el campo de la traumatología (Stevens *et al.*, 2005).
 - La gelatina, fácil de purificar a partir de ciertos tejidos animales.

- El quitosán, biomaterial obtenido a partir de la quitina existente en el exoesqueleto de los crustáceos marinos tales como los cangrejos o las gambas. Aunque permiten el crecimiento celular en su interior, el distante origen filogenético de los artrópodos hace que en ocasiones se comporte como un biomaterial de difícil biointegración en seres humanos.

- Otros biomateriales como el ácido hialurónico o el alginato, que aunque son biocompatibles, son degradados por el organismo tras un periodo de tiempo más o menos largo, aunque esta degradación no es enzimática (no existen enzimas en el organismo que sean capaces de degradar directamente estos polímeros).

- Biomateriales mixtos. La combinación de diferentes tipos de biomateriales permite controlar algunos de los problemas asociados a cada uno de ellos. Entre las diferentes combinaciones existentes, los biomateriales mixtos de fibrina y agarosa han demostrado su utilidad en la generación de tejidos humanos artificiales para su posible uso clínico en oftalmología, odontología y cirugía maxilofacial (Alaminos *et al.*, 2006, 2007; Sánchez-Quevedo *et al.*, 2007; Garzón *et al.*, 2009 (1) y 2009 (2); González-Andrades *et al.*, 2009; Serrato *et al.*, 2009; Ionescu *et al.*, 2010). En este contexto, nuestro grupo de investigación ha desarrollado un nuevo sustituto estromal compuesto por fibrina humana y agarosa tipo VII que ha mostrado propiedades estructurales y biomecánicas apropiadas cuando se utiliza para la generación de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular. Utilizando estos biomateriales, hasta el momento hemos logrado generar piel, mucosa oral y córneas humanas artificiales (Alaminos *et al.*, 2006, 2007; Sánchez-Quevedo *et al.*, 2007; González-Andrades *et al.*, 2009; Garzón *et al.*, 2009).

B. TÉCNICAS DE ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Una vez que los sustitutos artificiales son generados en laboratorio, el análisis histológico es una parte fundamental de los procesos de evaluación y control de la calidad de dichos tejidos. Hasta la fecha, se han descrito y optimizado un gran número de técnicas y métodos enfocados hacia el análisis histológico de todo tipo de tejidos humanos. Sin embargo, el reciente desarrollo de la ingeniería tisular, con la consiguiente aparición de nuevos tejidos creados en laboratorio, no se ha acompañado de nuevas técnicas histológicas específicas para este tipo de tejidos.

A continuación, describiremos brevemente el fundamento de las técnicas histológicas disponibles hasta el momento y diseñadas básicamente para el análisis de tejidos humanos nativos (www.dermato101.com.ar/técnica.pdf; www.monografias.com).

Las técnicas de análisis histológico permiten la evaluación microscópica de la estructura de un tejido concreto. Para ello, estas técnicas tienen que ser exactas y suficientemente sensibles y la imagen obtenida bajo el microscopio debe ser real y libre de artefactos.

Para su evaluación mediante el microscopio óptico, las muestras tisulares a analizar han de ser sometidas a una serie secuencial de pasos a través de los cuales la muestra llega a transformarse en delgados cortes teñidos capaces de ser observados al microscopio. Todo este proceso se denomina técnica histológica.

Los pasos principales de la técnica histológica, que estudiaremos a continuación, son obtención, fijación, inclusión, corte, tinción y montaje.

B.1.- Obtención.- que consiste en la provisión del material o muestra del tejido que se desea estudiar con el microscopio.

B.2.- Fijación.- es, en esencia, un método para la preservación de la morfología y la composición química de las células y los tejidos. Consiste en producir la muerte de las células de manera tal, que las estructuras que poseían éstas en estado vivo, se conserven con un mínimo de modificaciones, a lo largo del tiempo y de los subsiguientes pasos de la técnica.

Para llevar a cabo la fijación, el investigador utiliza los denominados agentes fijadores.

Las características fundamentales de los fijadores se pueden resumir a continuación:

- Producen una rápida muerte celular, evitando la autólisis.
- Preservan la morfología celular y tisular.
- Preservan la composición química.
- Penetran a los tejidos con relativa rapidez.
- Facilitan la coloración posterior.
- Inhiben el crecimiento microbiano y por lo tanto la putrefacción.
- Aumentan la consistencia de los tejidos.
- Algunos de ellos colorean sustancias de los tejidos.

Sin embargo, algunos fijadores pueden presentar los siguientes inconvenientes:

- Retraen los tejidos.
- Precipitan en forma de cristales.
- Endurecen demasiado las muestras.
- Poseen olor desagradable e irritan la piel y las mucosas.
- Producen alteraciones importantes a nivel molecular.
- Producen alteraciones importantes a nivel ultraestructural.

2.1.- Clasificación general de los fijadores

Existen numerosos tipos de fijadores. Por su interés, trataremos brevemente los fijadores físicos, y químicos.

2.1.1.- Fijadores Físicos. Producen su efecto provocando una modificación física de la estructura tisular.

- Calor. El calor produce artefactos de retracción violentos y desnaturaliza severamente la estructura proteica, por lo cual casi no se emplea.
- Frío. Los métodos de congelación preservan adecuadamente la composición química y la estructura del tejido, aunque esta última podría verse afectada en algunos tipos tisulares concretos. La metodología ideal para la congelación de un tejido se basa en la criofijación de éste sin que se produzcan grandes cristales de hielo en su estructura, los cuales podrían generar artefactos y destrucción de parte del tejido. Los cristales de hielo constituyen el problema fundamental a la hora de criopreservar un tejido. Por ese motivo, la criofijación debe llevarse a cabo lo más rápidamente posible para que los cristales de hielo que se formen sean de pequeño tamaño y no logren alterar la estructura tisular. La rapidez del proceso de congelación permite también captar a las células en momentos críticos de su función, como en la exocitosis de vesículas secretoras. Una de las mayores utilidades del sistema de congelación es obtener rápidamente cortes histológicos durante una cirugía, permitiendo realizar un diagnóstico intraoperatorio, mientras el paciente permanece aún anestesiado. En estas biopsias por congelación, donde la rapidez del diagnóstico histopatológico es esencial para determinar la conducta quirúrgica, se utilizan por lo general micrótomos de congelación refrigerados (criostatos).

Diversos estudios demostraron que los resultados del análisis histológico varían dependiendo si los tejidos a estudiar se congelan o si se utilizan fijadores de tipo químico durante su procesamiento (Chiu, Loke, Ho, 1994).

- Deseccación. La desecación se emplea para fijar directamente material fresco sobre los portaobjetos (por ejemplo una gota de sangre).
- Microondas. El microondeado, recientemente incorporado como método de fijación, produce agitación molecular a nivel de los di-polos que es más o menos homogénea en todo el espesor de piezas de considerable tamaño. Su efecto se produce por una combinación del calor generado en el tejido y la precipitación *in situ* de las proteínas por ruptura de los puentes de hidrógeno.

2.1.2.- Fijadores químicos. Este tipo de agentes logra la fijación tisular mediante una serie de modificaciones químicas del tejido a evaluar. Los más utilizados son:

- Alcoholes – Metanol, Etanol.
- Aldehídos – Formaldehído (formol), Glutaraldehído.
- Ácidos – Acético, Pícrico, Ósmico.
- Sales – Bicromato de potasio, Biclouro de mercurio.

Algunos fijadores como el formol, el glutaraldehído, el bicromato y el bicloruro de mercurio actúan formando puentes cruzados entre las proteínas, dando lugar a fuertes uniones entre moléculas proteicas, siendo llamados por ello *fijadores generadores de puentes cruzados*. En contraposición, los alcoholes, la acetona y el ácido acético precipitan las proteínas en su lugar por alteración de los puentes de hidrógeno de las mismas sin dañar su estructura primaria y por ello se los denomina *fijadores de coagulación*. La fijación lograda por todos estos agentes suele ser de muy buena calidad, especialmente en el caso del formaldehído y el etanol, motivo por el cual estos fijadores se utilizan universalmente para el análisis histológico estructural. Sin

embargo, en muchas ocasiones la fijación no es capaz de mantener la composición química tisular.

Para el estudio de la cromatina y los cromosomas, se emplean frecuentemente los fijadores ácidos (generalmente con ácido acético), y para el estudio de la actividad enzimática se emplean la acetona, el glutaraldehído o el formaldehído, que preservan un gran número de sistemas enzimáticos celulares.

Hoy en día, el fijador histológico universal de mayor versatilidad frente a los diferentes tejidos, de fácil utilización y económico, que cumple mejor con las propiedades antes citadas y con mínimos efectos indeseables, es el *formol*.

Con el nombre de formol puro se conoce la solución al 40 % de formaldehído en agua. El esta solución se diluye al 10 % en agua o buffer (9 partes del solvente y 1 parte de formol puro) para su utilización, por lo que el formaldehído en ella se encuentra al 4 %. El formaldehído es bastante inestable en solución, degenerando en ácido fórmico, el cual es muy mal fijador. Para evitar que el ácido fórmico deteriore los tejidos, éste se neutraliza con carbonato de calcio o con soluciones buffer, resultando el formol neutro en el primer caso y el formol tamponado en el segundo. La solución de formol al 10 % tiene un extraordinario poder de penetración a los tejidos, pudiendo fijarse piezas relativamente grandes, pero su penetración y de fijación son lentas, demorando para ello no menos de 8 horas y siendo óptimo entre 12 y 24 horas. El formaldehído reacciona con los grupos amino y carboxilo de las proteínas, y produce entonces uniones de metileno no solo dentro de una misma proteína sino que además lo hace con otras moléculas proteicas adyacentes (efecto conocido como *cross-linking* o formación de puentes cruzados). Este fenómeno sigue ocurriendo a lo largo del tiempo y deteriora de forma progresiva la estructura molecular de los tejidos, en especial de las proteínas, lo que dificulta el acceso de los anticuerpos hacia sus epitopos, fenómeno conocido como enmascaramiento antigénico. Esto puede ser reversible inicialmente a través de una corta digestión enzimática de las proteínas o con microondeado, que rompen parte de los puentes cruzados entre las proteínas. Si la

fijación se prolonga a lo largo del tiempo más allá de las 36 horas comienzan los fenómenos de sobre-fijación que son progresivamente irreversibles.

B.3.- Inclusión.- Una vez fijadas las muestras, es necesario inducir un proceso de endurecimiento de las mismas que nos permita llevar a cabo el corte de éstas utilizando micrótomos específicos. Con el fin de endurecer los tejidos existen dos métodos principales:

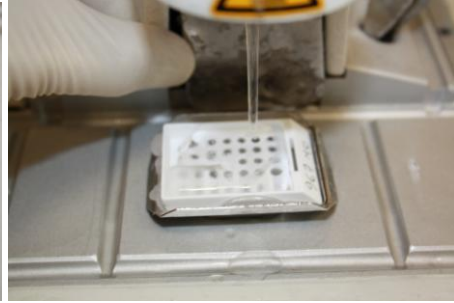
- **Inclusión en parafina.** Una de la técnicas histológicas más frecuentemente usadas para el procesamiento de muestras de tejido para su análisis histológico es la técnica de **inclusión en parafina** (Lewis *et al.*, 2001; Frantz *et al.*, 2001). El procedimiento es lento pero los preparados son de gran calidad. El tejido se impregna en un material que le confiere una consistencia adecuada para el corte. Para los cortes que deben observarse con el microscopio óptico, se usa casi exclusivamente la parafina. Dado que ésta es una sustancia hidrofóbica, los tejidos fijados se deshidratan previamente en alcoholes de concentración creciente, pasándolos después por solventes intermediarios como el xileno, el benceno o el tolueno (conocidos como agentes aclarantes) y, luego, son colocados en una estufa con parafina fundida entre 56 y 60°C, dado que ésta es sólida a temperatura ambiente. Tras impregnar de parafina el tejido, se deja solidificar a la parafina con el tejido incluido, constituyendo los bloques (Figura 8).



A



B



C



D

Figura 8. Inclusión de muestras de tejido oral artificial en parafina utilizando una estación específica para la inclusión de tejidos.

➤ Congelación. El sistema de congelación se utiliza, por ejemplo, para obtener rápidamente cortes histológicos durante una cirugía para realizar un diagnóstico intraoperatorio. Para ello, se utilizan micrótomos de congelación refrigerados. Como se indicó, esta técnica permite obtener cortes de tejido con su estructura química prácticamente inalterada. Para favorecer el proceso de congelación y evitar en lo posible la formación de artefactos (fundamentalmente por cristales de hielo), las muestras se pueden congelar sumergidas en un agente crioprotector que permita el corte en criostato (Figura 9). Uno de los más utilizados es el denominado *OCT* (*optimal cutting temperature*). El *OCT* se utiliza frecuentemente para la realización de cortes en congelación de tejidos humanos, y presenta las siguientes ventajas:

- La principal ventaja de sustituir la fijación química por la congelación es mantener la capa de hidratación de las estructuras macromoleculares (ácidos nucleicos, material extracelular, membranas, etc.), resultando una conservación estructural y disminución de la pérdida de los componentes celulares (Hippe-Sanwald, 1993; Dahl and Staehelin, 1989).
- Es un método de criofijación ultrarápido en comparación con los métodos de fijación química (Dahl and Staehelin, 1989).
- Además, permite una preservación eficiente de la mayor parte de epítomos de la proteína para facilitar análisis proteínicos, tales como el análisis inmunológico, en las muestras de tejidos embebidos en *OCT* (Naber *et al.*, 1992; Rahimi *et al.*, 2006).

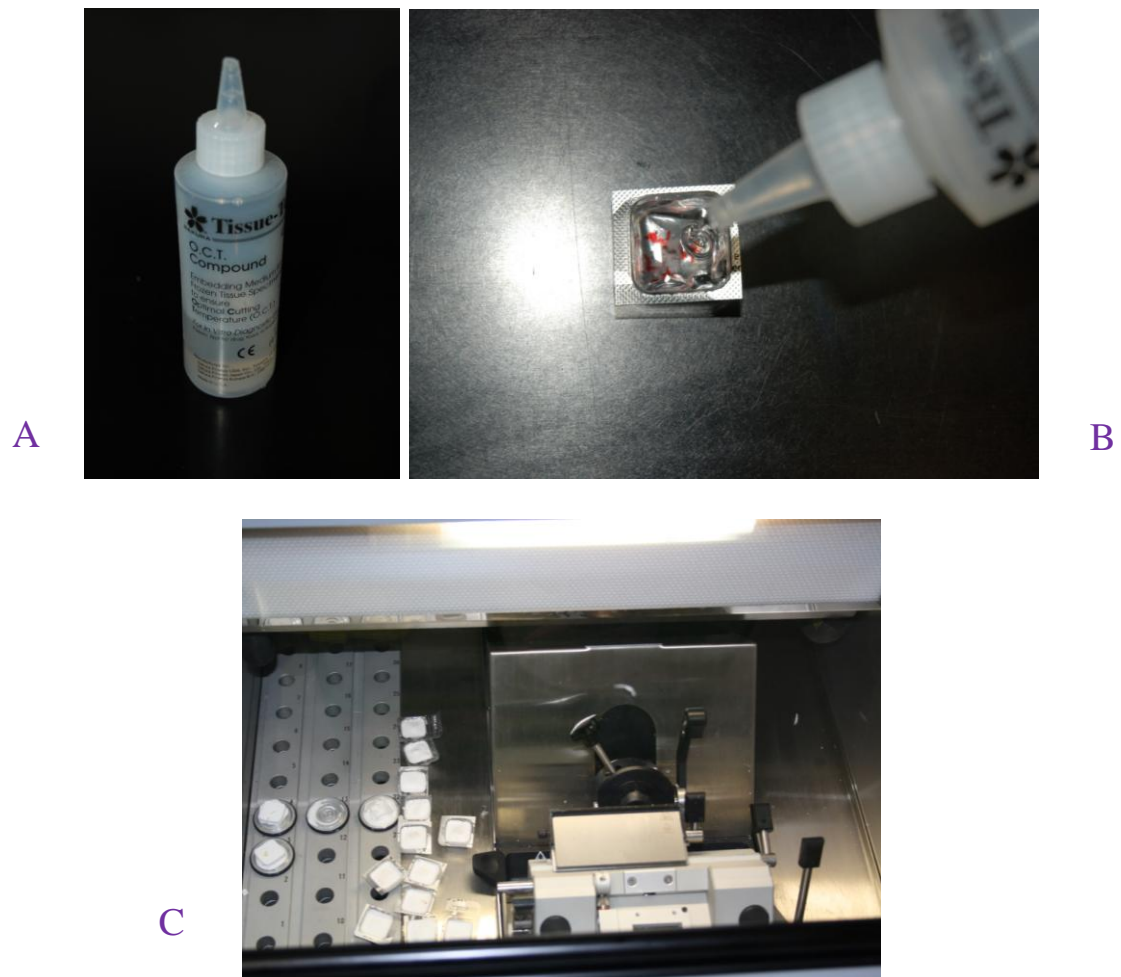


Figura 9. Inclusión de muestras en OCT para su procesamiento en criostato. A) OCT, B) La muestra del tejido se introduce en un soporte plástico para su inclusión en OCT, C) criostato en el que se realizan los cortes histológicos.

B.4.- Corte. Los tejidos deben ser cortados en láminas delgadas para posibilitar su observación en el microscopio. Para la obtención de cortes finos es un requisito indispensable que el tejido esté previamente endurecido hasta un cierto punto. Cuanto mayor sea la firmeza del tejido, tanto más delgado podrá realizarse el corte histológico. Los instrumentos utilizados para la obtención de cortes son los micrótomos (Figura 10). Básicamente, todos los tipos de micrótopo constan de una cuchilla muy afilada que seccionará el bloque histológico y un mecanismo de avance automático regulable de pocos micrometros (habitualmente, entre 5 y 8 μm).

Si empleamos la inclusión en parafina, los cortes obtenidos pueden presentar pequeños pliegues y arrugas que pueden eliminarse en agua tibia, debido a la elevada tensión superficial del agua cuando los cortes flotan en ella (Figura 11). Luego de ello, se recogen sobre porta-objetos, adhiriéndose a ellos generalmente a través de adhesivos como el *silane* o la poli-L-lisina. Los cortes se secan y luego se pasan por solventes intermediarios como el xileno, benceno o el tolueno y se hidratan en alcoholes de concentración decreciente hasta llevarlos al agua destilada para su posterior tinción histológica

Si empleamos la criofijación, usando técnicas por congelación, un tejido congelado es suficientemente duro para ser cortado, especialmente si hemos utilizado la inclusión en *OCT*. En este caso, los cortes obtenidos se depositan directamente en los portaobjetos para su análisis histológico.

A

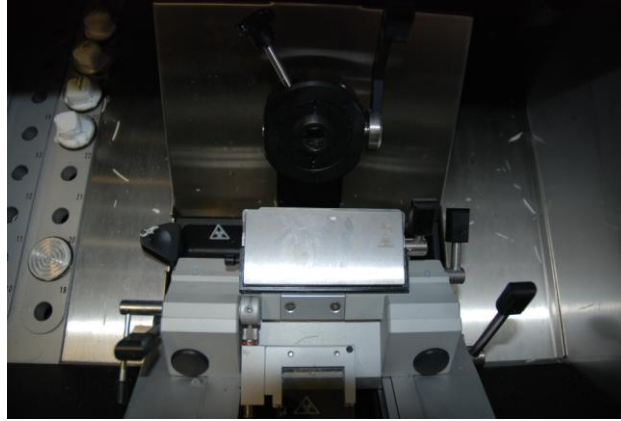


Figura 10. Microtomos: A) Criostato para el procesamiento de muestras de tejidos congelados, B) Microtomo para la realización de cortes de muestras de tejidos incluidos en parafina



Figura 11. Obtención de secciones de tejidos artificiales incluidos en parafina. Con la técnica de inclusión en parafina, al realizar el corte del bloque, pueden presentarse pliegues, los cuales se eliminan sumergiendo este corte en agua caliente, eliminando así, irregularidades del tejido.

B.5.- Tinción o coloración. La obtención de cortes delgados soluciona uno de los inconvenientes de la observación microscópica pero hace evidente a otro de ellos: si bien permite que los cortes sean transparentes, la falta de colores y contrastes en las estructuras celulares no permiten visualizar prácticamente ningún componente.

La tinción o coloración se efectúa con dos propósitos:

- La coloración rutinaria trata de posibilitar el estudio morfológico o estructural, sin que se pueda obtener mayor información sobre la naturaleza química de las estructuras observadas.
- La histoquímica utiliza métodos tendientes a identificar un determinado tipo de molécula o sustancia, visualizándola microscópicamente.

La mayoría de los colorantes citológicos o histológicos que se utilizan actualmente son de dos tipos fundamentales:

- **Básicos:** En los colorantes básicos el grupo que imparte el color (grupo cromóforo) es básico (catiónico). Las estructuras que tienen afinidad por colorantes básicos se denominan basófilas, siendo habitualmente estructuras de carácter ácido. Por ejemplo, la hematoxilina es un colorante básico capaz de teñir de morado las estructuras ácidas como el núcleo celular (Figura 12)
- **Ácidos:** Este tipo de colorantes se caracteriza por poseer un pH inferior a 7. Las estructuras que tienen afinidad por colorantes ácidos se denominan acidófilas, siendo habitualmente estructuras de carácter básico. Uno de los colorantes ácidos más utilizados es la eosina, que tiñe los citoplasmas celulares de color anaranjado o rosáceo.

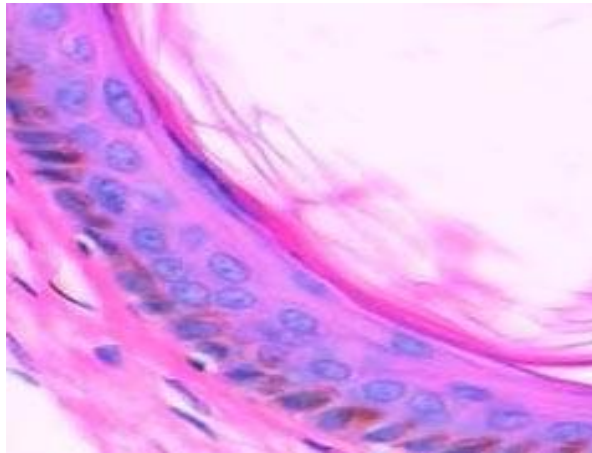


Figura 12. Muestra de tejido humano procesado según la técnica descrita en esta Tesis Doctoral y teñida con hematoxilina-eosina.

B.6.- Montaje. Consiste en colocar sobre el corte histológico ya coloreado una delgada lámina de vidrio (*cubreobjetos*), la cual se adhiere con algún adhesivo transparente (Figura 13). Previamente, y dado que los adhesivos son unas sustancias hidrofóbicas, los cortes se deshidratan en alcoholes de concentración creciente, pasándolos después por solventes intermediarios como el xileno, el benceno o el tolueno.



Figura 13. Muestra de tejido teñido con hematoxilina-eosina, en la cual se coloca cubreobjetos, para su análisis histológico.

C. CRIOPRESERVACION

Algunos animales se congelan en estado sólido durante los meses de invierno y retornan a su estado normal en primavera. Esta habilidad natural para sobrevivir a la congelación podría tener, utilidad en la preservación por congelación de tejidos humanos, (Storey, 1990; Storey and Storey, 1992, 1996). Para una amplia variedad de animales, la supervivencia de invierno en los climas fríos incluye la capacidad de tolerar la formación de hielo en los fluidos corporales intracelulares y extracelulares (Rubinsky *et al.*, 1994). Entre los vertebrados terrestres algunos de éstos han desarrollado el proceso de hibernación, que es la tolerancia a las bajas temperaturas. Esta tolerancia se ha documentado, entre otras, en cinco especies de anfibios y dos especies de reptiles. Estas especies pueden sobrevivir durante días o semanas en estado de congelación, sin respiración y sin latido del corazón, y con hasta un 65% del agua total del cuerpo en forma de hielo extracelular (Storey *et al.*, 1988; Churchill and Storey, 1992). Los mecanismos bioquímicos involucrados en la tolerancia a las heladas naturales incluyen (1) la estabilización de las proteínas en la formación de hielo extracelular en los fluidos corporales (Baust, 1991; Packard and Packard, 2004), (2) la acumulación de altas concentraciones de carbohidratos de bajo peso molecular como crioprotectores para regular la reducción del volumen celular durante la congelación y la estabilización de la estructura de macromoléculas (Constanzo *et al.*, 2003), y (3) un sistema bien desarrollado de tolerancia a la isquemia que apoya la supervivencia de los distintos órganos, mientras que éstos están, congelados (Storey,1990).

En biología celular, la crio-preservación (Pegg, 2007) se define como la técnica para preservar intactas las estructuras de células y tejidos cuando son sometidas a temperaturas bajas. De lo contrario, la congelación sin protección sería letal. Los efectos biológicos de enfriamiento están dominados por la congelación del agua, que se traduce en la concentración de solutos que se disuelven en la fase de líquido restante. Se cree que la congelación o bien los cristales de hielo, no provocan la perforación o separación de las células, sino que esto ocurre, por la acción mecánica directa, o que el daño celular es ocasionado por efectos secundarios a través de cambios en la composición de la fase líquida (Franks, 1985; Lundheim and Zachariassen, 1993). Los crio-protectores, al aumentar su concentración total de todos los solutos en el sistema, reducen la cantidad de hielo que se forma a cualquier temperatura, pero para ser biológicamente aceptables, deben ser capaces de penetrar en las células y tener baja toxicidad. Entre los compuestos que presentan estas propiedades, se encuentra la glicerina, el dimetil-sulfóxido, etanodiol y propanodiol. Si se conoce la permeabilidad de la membrana celular es posible predecir el efecto de la velocidad de enfriamiento en la supervivencia celular y la tasa óptima será un equilibrio entre el riesgo de congelación intracelular y los efectos de los solutos concentrados (Barthel and Raymond, 1990; Naber *et al.*, 1992; Loken and Demetrick, 2005).

En este contexto, uno de los métodos de crio-preservación más utilizados en medicina y odontología es la vitrificación, que se define como, la producción de un estado cristalino en el que la viscosidad alcanza un valor lo suficientemente alto como para comportarse como un sólido, pero sin ningún tipo de cristalización y sin formación de hielo.

Cuando el material de partida es un líquido, necesitaremos un enfriamiento muy rápido o la introducción de agentes anticongelantes que impidan la formación de cristales. De forma natural, las ranas, peces e insectos árticos producen **glicerol** y **glucosa** para reducir la formación de hielo (Jack *et al.*, 1995; Zachariassen, 1991). En el laboratorio, esta técnica se utiliza ampliamente como método de crio-conservación de embriones y ovocitos. Dicha vitrificación se consigue mediante un enfriamiento muy rápido en el cual se utiliza una solución altamente concentrada que no cristaliza durante la congelación, en su viscosidad aumenta con el descenso de temperatura hasta la formación de un estado sólido amorfo. La exposición y las tasas de congelación deben ser lo suficientemente rápidas para evitar la toxicidad y la formación de cristales intracelulares que puedan dañar el contenido celular. Para conseguir que la deshidratación sea muy rápida se utilizan crio-protectores en concentraciones elevadas. Antes de la congelación, el material biológico debe equilibrarse con esta solución crio-protectora (en menor concentración) para que éste pueda soportar el choque osmótico. La tasa de supervivencia de las muestras es mayor del 90%, y los embriones sobreviven intactos (Cao and Chian, 2009; Nagy *et al.*, 2009).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es establecer y optimizar una técnica de análisis histológico que permita un adecuado procesamiento de muestras de tejido humano artificial basado en biomateriales de fibrina y agarosa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Generar tejidos orales artificiales mediante técnicas de ingeniería tisular utilizando biomateriales de fibrina y agarosa como matrices extracelulares.
- 2.- Evaluar histológicamente distintos protocolos de criofijación de los tejidos orales artificiales utilizando agentes crioprotectores químicos (acetona, ácido acético, formaldehído y glutaraldehído).
- 3.- Evaluar histológicamente protocolos de criofijación de los tejidos orales artificiales utilizando distintas concentraciones de glucosa como agente crioprotector.
- 4.- Evaluar histológicamente protocolos de criofijación de los tejidos orales artificiales utilizando distintas concentraciones de maltosa como agente crioprotector.
- 5.- Evaluar histológicamente protocolos de criofijación de los tejidos orales artificiales utilizando distintas concentraciones de trehalosa como agente crioprotector.
- 6.- Establecer criterios de selección para el análisis histológico de tejidos orales artificiales utilizando los agentes crioprotectores evaluados en esta Tesis Doctoral.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. ELABORACIÓN DE TEJIDOS ORALES ARTIFICIALES

BASADOS EN BIOMATERIALES DE FIBRINA Y

AGAROSA

Los diferentes tejidos orales artificiales utilizados en esta Tesis Doctoral se generaron a partir de plasma humano congelado procedente de donantes de sangre (proporcionado por el Dr. Fernández Montoya, del Banco de Tejidos Humanos de Granada) y agarosa tipo VII al 0,1% (p/v).

Para ello, se emplearon 21 ml de plasma humano, al cual se agregaron 2 ml de medio de cultivo *DMEM* (*medio de Eagle modificado por Dulbecco*) con un 10% de *FBS* (*suero bovino fetal*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) (Alaminos *et al.*, 2006,2007; Sánchez-Quevedo *et al.*, 2007). Para prevenir la degradación del hidrogel de fibrina ocasionada por la fibrinólisis espontánea del coágulo de plasma humano, a la mezcla se añadieron 200 µl de ácido tranexámico (Amchafibrin[®], Fides Ecopharma, Valencia). Posteriormente, se agregaron a la solución 2 ml de CaCl₂ al 1% para precipitar la polimerización de la fibrina e inducir la formación de un hidrogel de fibrina. Finalmente, a la mezcla se añadió 1 ml de agarosa tipo VII (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) previamente disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión, para lograr una concentración final de agarosa de 0,1% en el hidrogel.

La mezcla se inoculó rápidamente en cajas de Petri y se incubó a 37°C por 2 horas hasta su total polimerización (Figura 14).



Figura 14. Reactivos para la elaboración de tejidos artificiales de fibrina-agarosa por ingeniería tisular.

B. PROTOCOLOS DE CRIOPROTECCIÓN PARA EL ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS TEJIDOS ORALES ARTIFICIALES BASADOS EN BIOMATERIALES DE FIBRINA Y AGAROSA

Una vez generados en laboratorio los tejidos orales artificiales basados en biomateriales de fibrina y agarosa, se procedió a someter a las muestras a diferentes protocolos de crioprotección basados en agentes químicos, glucosa, maltosa o trehalosa (Figura 15).

Para ello, en primer lugar, los tejidos orales artificiales de fibrina-agarosa se cortaron en pequeños fragmentos de aproximadamente 0,5 x 0,5 x 0,25 cm y cada pieza se incubó durante diferentes tiempos en un agente crioprotector. En concreto, en esta Tesis Doctoral se utilizaron los siguientes agentes crioprotectores durante los tiempos de incubación que se indican a continuación:

1) Muestras incubadas durante 60 minutos uno de los siguientes agentes químicos:

- Acetona 100%
- Ácido acético 100%
- Formaldehido 4% (formol).
- Glutaraldehido 3%

2) Muestras incubadas en soluciones de glucosa a diferentes concentraciones (0,002M, 0,020M, 0,050M, 0,080M, 0,100M, 0,0200M, 0,0300M y 0,0400M) durante 30, 60 y 120 minutos.

3) Muestras incubadas en soluciones de maltosa a diferentes concentraciones (0,002M, 0,020M, 0,050M, 0,080M, 0,100M, 0,0200M, 0,0300M y 0,0400M) durante 30, 60 y 120 minutos.

4) Muestras incubadas en soluciones de trehalosa a diferentes concentraciones (0,002M, 0,020M, 0,050M, 0,080M, 0,100M, 0,0200M, 0,0300M y 0,0400M) durante 30, 60 y 120 minutos.

Todas las soluciones crioprotectoras de glucosa, maltosa y trehalosa se prepararon en agua destilada a temperatura ambiente.



Figura 15. Crioprotectores para muestras de tejidos orales artificiales generados por ingeniería tisular. A) azúcares; B) Agentes químicos (acetona, ácido acético, formaldehído y glutaraldehído).

C. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Una vez incubadas todas las muestras en las diferentes soluciones crioprotectoras, se procedió a su inclusión en *OCT* (*optimal cutting temperature*) (Sakura Finetek, EEUU) y a su congelación cuidadosa en nitrógeno líquido. Una vez congeladas, se realizaron cortes de 5 μm de espesor de cada muestra utilizando un criostato a -20°C . Los cortes así obtenidos se colocaron en portaobjetos, se fijaron durante 5 minutos en formol 4% y se procedió a su tinción con hematoxilina y eosina, cubriéndose con cubreobjetos de vidrio siguiendo técnicas habituales (Figura 16).

Para la identificación de artefactos tisulares derivados de la formación de cristales de hielo en los tejidos orales artificiales, se evaluó la estructura de estos tejidos utilizando un microscopio óptico ECLIPSE 90i (Nikon Ltd., Tokio, Japón) (Figura 17). En cada muestra, se realizaron microfotografías a diferentes aumentos, y se utilizó el programa de análisis de imagen NIS-AR 30IE del propio microscopio en modo de detección automática de áreas (Figura 18). Este software permite, además, la identificación automática de todos los espacios vacíos en cada imagen y minimiza la posibilidad de errores. De este modo, se procedió a la cuantificación del área y del diámetro de los espacios interfibrilares generados en el tejido artificial de fibrina-agarosa como resultado de la formación de cristales de hielo. En todos los casos, se tomaron 10 imágenes de cada muestra, cuantificándose el área y el diámetro de 10 espacios en cada una de ellas.

El área y el diámetro promedio de todos los espacios analizados en este trabajo fueron de $6938,6\ \mu\text{m}^2$ y $69,3\ \mu\text{m}^2$, respectivamente.

Como control negativo (muestras con un gran número de artefactos derivados de la formación de cristales de hielo), algunos tejidos orales artificiales se incluyeron directamente en *OCT* y se congelaron y procesaron exactamente del mismo modo que

el resto de las muestras, pero sin haber sido previamente incubadas en ningún agente crioprotector.

Como control positivo (muestras sin artefactos aparentes), un grupo de muestras se fijaron durante 2 horas en formol al 4% y se incluyeron en parafina siguiendo procedimientos estándar. Brevemente, las muestras fijadas en formol fueron lavadas en agua y deshidratadas en series crecientes de etanol (50, 70, 96 y 100%). Posteriormente, el etanol fue sustituido por tolueno y las muestras se aclararon 3 veces en xilol. Finalmente, las muestras se incluyeron en parafina. Una vez formados los bloques, se realizaron cortes de 5 μm de espesor utilizando un micrótopo (Figura 19).



Figura 16. Las muestras de tejidos orales artificiales generados por ingeniería tisular se incubaron en soluciones crioprotectores para: A) su inclusión en OCT y congelación en nitrógeno líquido, B) cortes de 5 μm en criostato y colocación en portaobjetos, C) tinción de hematoxilina-eosina y colocación del cubreobjetos.

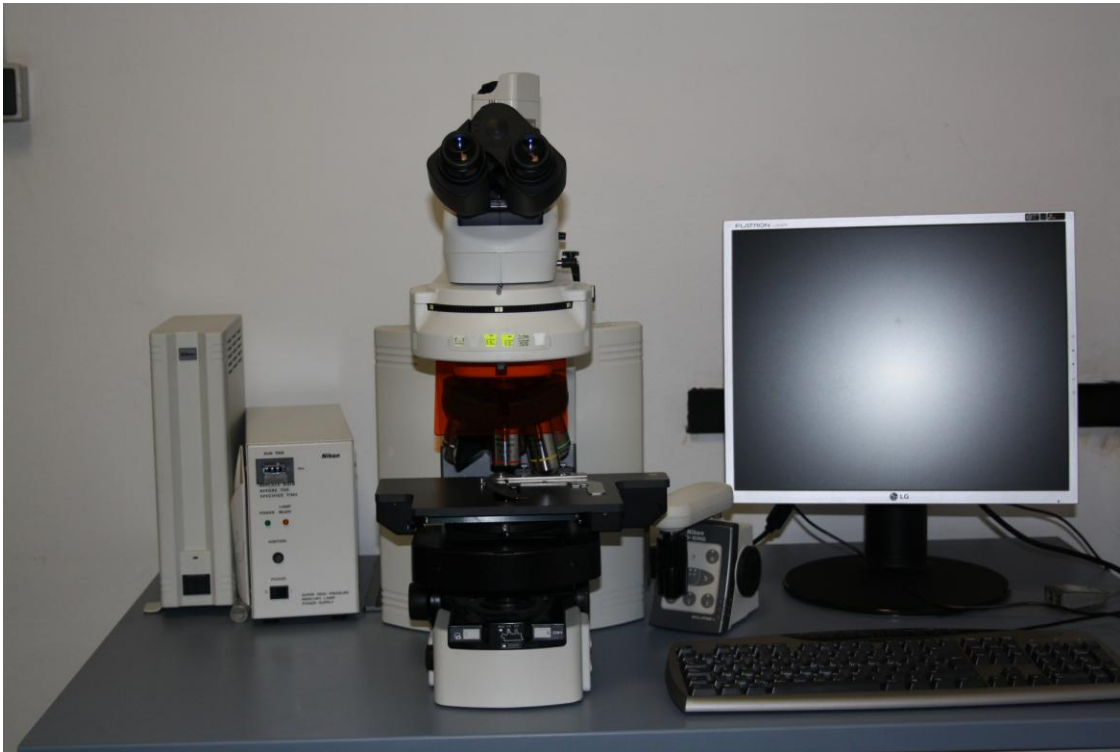


Figura 17. Microscopio óptico ECLIPSE 90i utilizado en esta Tesis Doctoral (Nikon Ltd., Tokio, Japón).

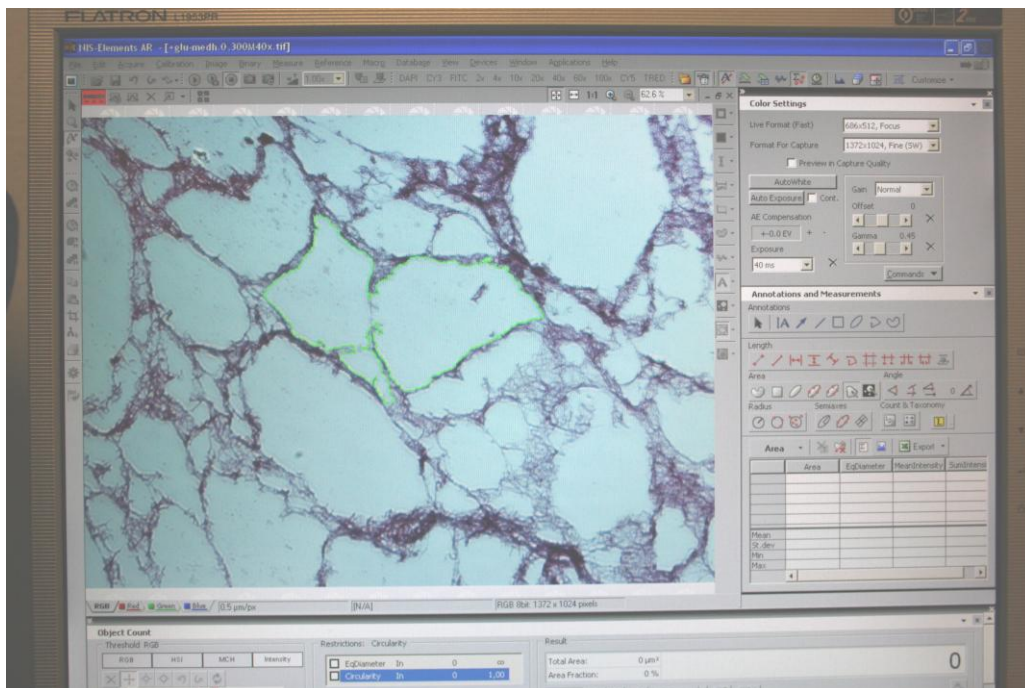
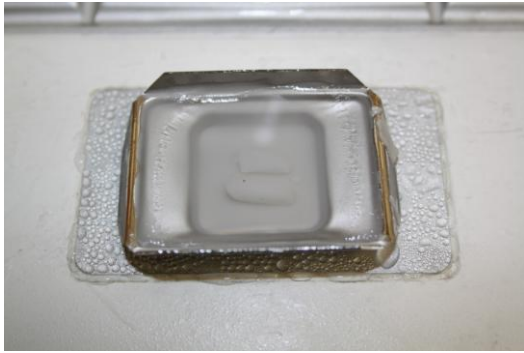


Figura 18. Software utilizado para el análisis del diámetro y el área de los espacios interfibrilares generados por la formación de cristales de hielo en las muestras (artefactos).



A



B



C



Figura 19. Para su inclusión en parafina, las muestras de tejidos orales artificiales generados por ingeniería tisular se fijaron en formol, se deshidrataron en alcoholes, tolueno y xilol para posteriormente: A) colocar parafina líquida, B) elaborar el bloque de parafina, C) cortar la muestra y eliminar las arrugas, para llevarlo a portaobjetos y realizar la tinción.

D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comparar el diámetro y el área de los espacios interfibrilares generados por la formación de cristales de hielo en las muestras (artefactos), se procedió del siguiente modo:

1- En primer lugar, se calcularon los valores promedio (media) y la desviación estándar para cada protocolo de análisis y tanto para el área como para el diámetro de los espacios interfibrilares.

2- En segundo lugar, se utilizó el test no-paramétrico *U* de Mann-Whitney para la comparación tanto del área como del diámetro de los espacios interfibrilares entre distintos protocolos de criofijación. Para cada una de las comparaciones, se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias que se asociaron a niveles de significación estadística menores de 0,001 para las pruebas de doble cola tras el ajuste de Bonferroni, debido a que se utilizaron más de 50 análisis estadísticos al mismo tiempo. Los valores de $p=0,001$ se consideraron marginalmente significativos, siendo los valores mayores de 0,001 no significativos.

Para realizar el análisis descrito anteriormente, se utilizó el software SPSS 13.0 (Figura 19).

RESULTADOS

A. GENERACIÓN DE TEJIDOS ORALES ARTIFICIALES BASADOS EN BIOMATERIALES DE FIBRINA Y AGAROSA MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

La aplicación de los métodos y técnicas descritos en el apartado Materiales y Métodos de esta Tesis Doctoral nos permitió elaborar eficientemente tejidos orales artificiales de fibrina y agarosa. Estos tejidos artificiales mostraron coloración rosácea y adecuados niveles de consistencia (Figura 20).

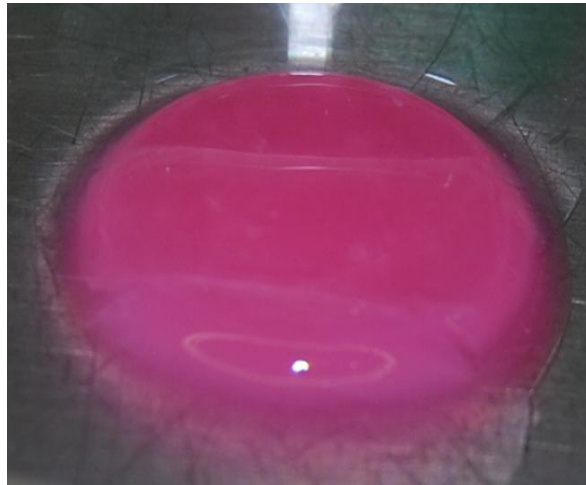


Figura 20. Tejido oral artificial de fibrina y agarosa mediante ingeniería tisular.

B. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS

CONTROL

Como control positivo, los tejidos orales artificiales fueron fijados en formol y embebidos (incluidos) en parafina. El análisis histológico de estas muestras mostró una estructura tisular adecuada, conservándose la estructura de las fibras de la matriz artificial de fibrina y agarosa, no existiendo grandes espacios interfibrilares derivados de la formación de cristales de hielo durante el procedimiento (Figura 21 A).

El análisis del área y del diámetro de los espacios interfibrilares mediante el programa de análisis de imagen mostró un área media de $44,4 \pm 25,2 \mu\text{m}^2$ y un diámetro medio de $7,2 \pm 2,3 \mu\text{m}$ (Tabla 1).

Como control negativo, en esta Tesis Doctoral se utilizaron tejidos artificiales incluidos en OCT sin la utilización previa de ningún agente crioprotector. La estructura y arquitectura de los tejidos artificiales observados con este procedimiento mostraron pobres resultados, existiendo gran desorganización de las fibras de fibrina-agarosa y la presencia de grandes espacios, aberturas y grietas entre las mismas, con un área media de $8557,7 \pm 7273,9 \mu\text{m}^2$ y un diámetro promedio de $95,5 \pm 44,4 \mu\text{m}$. Además, los cortes eran difíciles de realizar, debido a que la consistencia de los tejidos era muy pobre (Figura 21B).

El análisis estadístico para la comparación de áreas y diámetros entre las muestras control positivo y control negativo resultó altamente significativa ($p=0,000$ tanto para el área como para el diámetro).

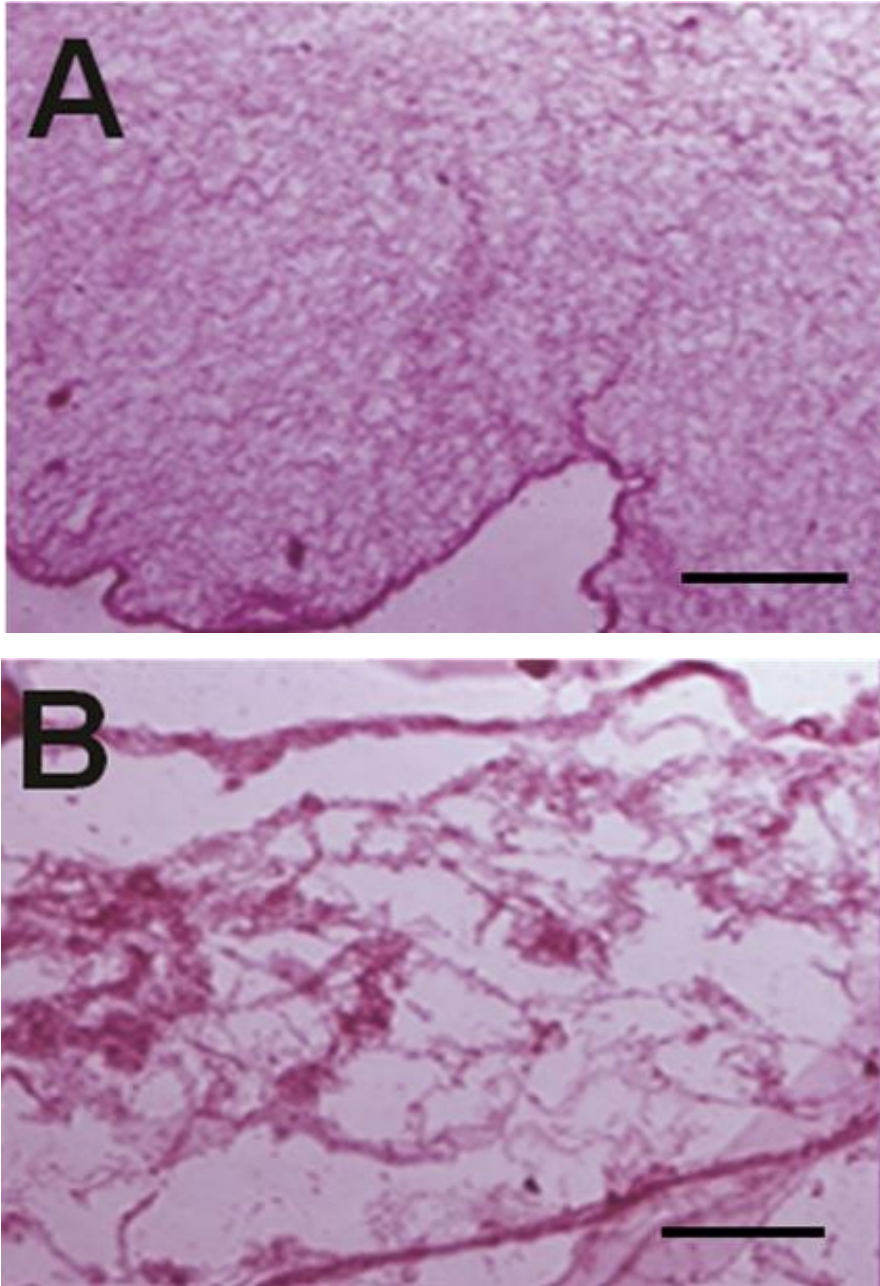


Figura 21. Análisis de los tejidos orales artificiales utilizados como control positivo (A) y negativo (B), correspondientes a muestras incluidas en parafina y muestras embebidas en OCT sin agente crioprotector, respectivamente.

C. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE MUESTRAS PREVIAMENTE INCUBADAS EN AGENTES QUÍMICOS

Los tejidos orales artificiales previamente tratados con acetona, ácido acético, formaldehído o glutaraldehído, embebidos en OCT y fijados en nitrógeno líquido, fue difícil realizar los cortes en el criostato. De hecho, la generación de criosecciones fue muy complicada por la falta de consistencia de los tejidos artificiales. Además, los tejidos artificiales fueron altamente desorganizados, con la presencia de grandes espacios, hendiduras y fisuras en donde sus áreas fueron de 322,5, 453,9, 356,7 y 368,1 μm^2 (Tabla 1). Las diferencias fueron estadísticamente significativas para la comparación frente a los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (controles positivos), tanto para el área como para el diámetro de los tejidos artificiales ($p < 0,001$). Ejemplos ilustrativos de tejidos orales artificiales crio fijados con estas técnicas se muestran en la Figura 22.

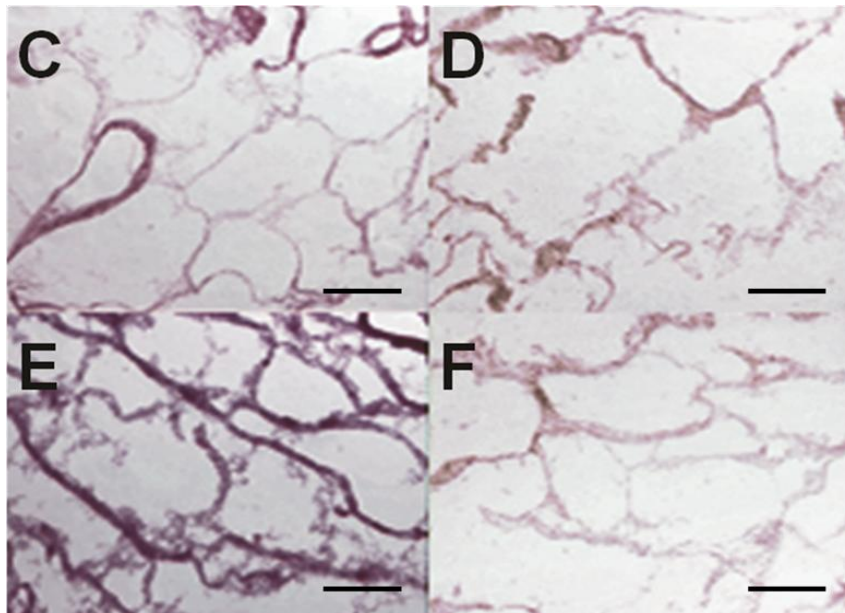


Figura 22. Análisis histológico de tejidos orales artificiales preincubados en diferentes agentes químicos e incluidos en OCT. C: Muestras pretratados con acetona; D: Muestras preincubadas en ácido acético glacial; E: Muestras preincubadas en formaldehído; F: Muestras pretratadas con glutaraldehído. Tinción con hematoxilina-eosina. Escala 1 μm .

AGENTE CRIOPROTECTOR	ÁREA PROMEDIO (μm^2)	DIÁMETRO PROMEDIO (μm)	ÁREA D.E.	DIÁMETRO D.E.	ÁREA RELATIVA	DIÁMETRO RELATIVO	P ÁREA VS CONTROL	P DIÁMETRO VS CONTROL
INCLUSIÓN EN PARAFINA (CONTROL POSITIVO)	44,4	7,2	25,2	2,3	1,0	1,0	-	-
INCLUSIÓN EN OCT (CONTROL NEGATIVO)	8557,7	95,5	7273,9	44,4	192,7	13,3	0,000	0,000
ACETONA	14320,5	130,8	7392,3	35,3	322,5	18,2	0,000	0,000
ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL	20155,2	145,5	21185,1	70,7	453,9	20,2	0,000	0,000
FORMALDEHIDO	15841,3	138,1	8017,4	35,1	356,7	19,2	0,000	0,000
GLUTARALDEHIDO	16344,1	141,0	7528,8	32,1	368,1	19,6	0,000	0,000

Tabla 1.- Resultados del análisis histológico de muestras de tejido oral artificial preincubado en diferentes agentes crioprotectores y de los controles positivo y negativo. En diferentes columnas se muestra el área media de los espacios interfibrilares de los tejidos incubados en los diferentes agentes y de los controles, el diámetro medio de dichos espacios, la desviación estándar (D.E.) de ambos parámetros, el área y el diámetro relativos (área o diámetro promedio obtenida con cada protocolo específico dividida entre el área o diámetro promedio del control positivo) y el valor de significación estadística p para la comparación del área o diámetro obtenido para cada protocolo concreto frente al área o diámetro del control positivo.

D. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE MUESTRAS PREINCUBADAS EN DISTINTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA

Cuando los tejidos orales artificiales se incubaron en diferentes concentraciones de glucosa (0,002M, 0,020M, 0,050M, 0,080M, 0,100M, 0,200M, 0,300M y 0,400M) durante 30 minutos, se encontró que, en general, las muestras presentaban baja consistencia al corte, lo cual dificultaba su manipulación en el criostato. A nivel estructural, el análisis microscópico reveló la existencia de grandes espacios entre las fibras de la malla, cuyas áreas oscilaron entre $15094,2 \pm 6361,4 \mu\text{m}^2$ y $22529,2 \pm 28962,7 \mu\text{m}^2$ y cuyos diámetros oscilaron entre $133,6 \pm 58,1 \mu\text{m}$ y $143,5 \pm 94,8 \mu\text{m}$. El área y el diámetro promedios de todas las concentraciones evaluadas fueron de $17737,7 \pm 2674,9 \mu\text{m}^2$ y $137,4 \pm 3,9 \mu\text{m}$ respectivamente. En comparación con las muestras control, los tejidos orales artificiales previamente tratados con glucosa durante un tiempo de 30 minutos presentaron áreas y diámetros significativamente mayores de aquéllas encontradas en las muestras embebidas en parafina para todas las concentraciones de glucosa ($p < 0,001$) (Tabla 2).

En segundo lugar, cuando los tejidos orales artificiales se pretrataron con diferentes concentraciones de glucosa durante 60 minutos, encontramos apropiada consistencia de los tejidos para glucosa 0,200M, 0,300M y 0,400M, siendo menor para concentraciones inferiores de glucosa. El área y diámetro promedio de los espacios encontrados en los tejidos artificiales incubados durante 60 minutos en las diferentes concentraciones de glucosa fueron $12206,9 \pm 3187,6 \mu\text{m}^2$ y $114,6 \pm 15,1 \mu\text{m}$, respectivamente, oscilando entre $6920,2 \pm 6669,9 \mu\text{m}^2$ y $16875,9 \pm 14345,9 \mu\text{m}^2$ para

el área y entre $87,3 \pm 36,5 \mu\text{m}$ y $134,9 \pm 60,5 \mu\text{m}$ para el diámetro. Las diferencias con las muestras control fueron estadísticamente significativas para todas las concentraciones ($p < 0.001$).

Finalmente, cuando los tejidos artificiales fueron incubados durante 120 minutos, nosotros encontramos que la consistencia de los tejidos fue apropiada cuando se emplearon concentraciones de glucosa al 0,100M, 0,200M, 0,300M, y 0,400M, presentándose inadecuada consistencia en muestras de tejidos artificiales incubados en concentraciones menores de glucosa. El área y diámetro promedio de los espacios en las diferentes concentraciones de glucosa y en el tiempo de 120 minutos fueron $7905,2 \mu\text{m}^2$ y $94,3 \mu\text{m}$ respectivamente, variando entre $5895,7 \pm 2242,4 \mu\text{m}^2$ y $11928,3 \pm 9143,5 \mu\text{m}^2$ para el área, y entre $84,8 \pm 18,6 \mu\text{m}$ y $116,5 \pm 42,5 \mu\text{m}$ para el diámetro. Las diferencias con las muestras control fueron estadísticamente significativas para todas las concentraciones ($p < 0,001$) (Tabla 2).

Ejemplos ilustrativos del análisis histológico de los tejidos orales artificiales preincubados en diferentes concentraciones de glucosa se muestran en la Figura 23.

TIEMPO	CONCENTRACIÓN	ÁREA PROMEDIO (µm ²)	DIÁMETRO PROMEDIO (µm)	ÁREA D.E.	DIÁMETRO D.E.	ÁREA RELATIVA	DIÁMETRO RELATIVO	P ÁREA VS CONTROL	P DIÁMETRO VS CONTROL
30 min	0,002M	16665,6	139,8	10575,7	43	375,3	19,4	0,000	0,000
	0,020M	16892,3	134,8	16745,9	61	380,4	18,7	0,000	0,000
	0,050M	16522,1	135,7	11575,3	54,1	372,1	18,8	0,000	0,000
	0,080M	21380	134,2	27634,5	101,2	481,5	18,6	0,000	0,000
	0,100M	16401,3	133,6	12035,7	58,1	369,4	18,5	0,000	0,000
	0,200M	22529,2	143,5	28962,7	94,8	507,4	19,9	0,000	0,000
	0,300M	15094,2	135,8	6361,4	29,5	339,9	18,9	0,000	0,000
	0,400M	16416,6	142,2	6318,7	27,7	369,7	19,7	0,000	0,000
60 min	0,002M	15636,6	129,8	14769,9	58,4	352,1	18	0,000	0,000
	0,020M	16875,9	134,9	14345,9	60,5	380	18,7	0,000	0,000
	0,050M	11516,3	114	8975,5	43,2	259,3	15,8	0,000	0,000
	0,080M	13929,5	123,7	11251,5	51,9	313,7	17,2	0,000	0,000
	0,100M	11574,8	108,9	12542,4	56,5	260,7	15,1	0,000	0,000
	0,200M	10048,2	105,5	8460,7	42,9	226,3	14,7	0,000	0,000
	0,300M	11153,4	112,6	7949	41,1	251,2	15,6	0,000	0,000
	0,400M	6920,2	87,3	6669,9	36,5	155,8	12,1	0,000	0,000
120 min	0,002M	10295,2	104	10423,4	50,5	231,8	14,4	0,000	0,000
	0,020M	11928,3	116,5	9143,5	42,5	268,6	16,2	0,000	0,000
	0,050M	7123,4	87,8	6235,6	38,8	160,4	12,2	0,000	0,000
	0,080M	7011,7	92,1	3428	22	157,9	12,8	0,000	0,000
	0,100M	7298,4	91,5	5058,9	31,9	164,4	12,7	0,000	0,000
	0,200M	6114,6	87	2242,4	15,7	137,7	12,1	0,000	0,000
	0,300M	5895,7	84,8	2520,7	18,6	132,8	11,8	0,000	0,000
	0,400M	7574,7	91,5	6105,3	37,7	170,6	12,7	0,000	0,000

Tabla 2.- Resultados del análisis histológico de muestras de tejido oral artificial preincubado en diferentes concentraciones de **glucosa** durante diferentes tiempos e incluidos en *OCT*. En diferentes columnas se muestra, para cada tiempo y concentración, el área media de los espacios interfibrilares de los tejidos incubados en los diferentes agentes y de los controles, el diámetro medio de dichos espacios, la desviación estándar (D.E.) de ambos parámetros, el área y el diámetro relativos (área o diámetro promedio obtenida con cada protocolo específico dividida entre el área o diámetro promedio del control positivo) y el valor de significación estadística p para la comparación del área o diámetro obtenido para cada protocolo concreto frente al área o diámetro del control positivo.

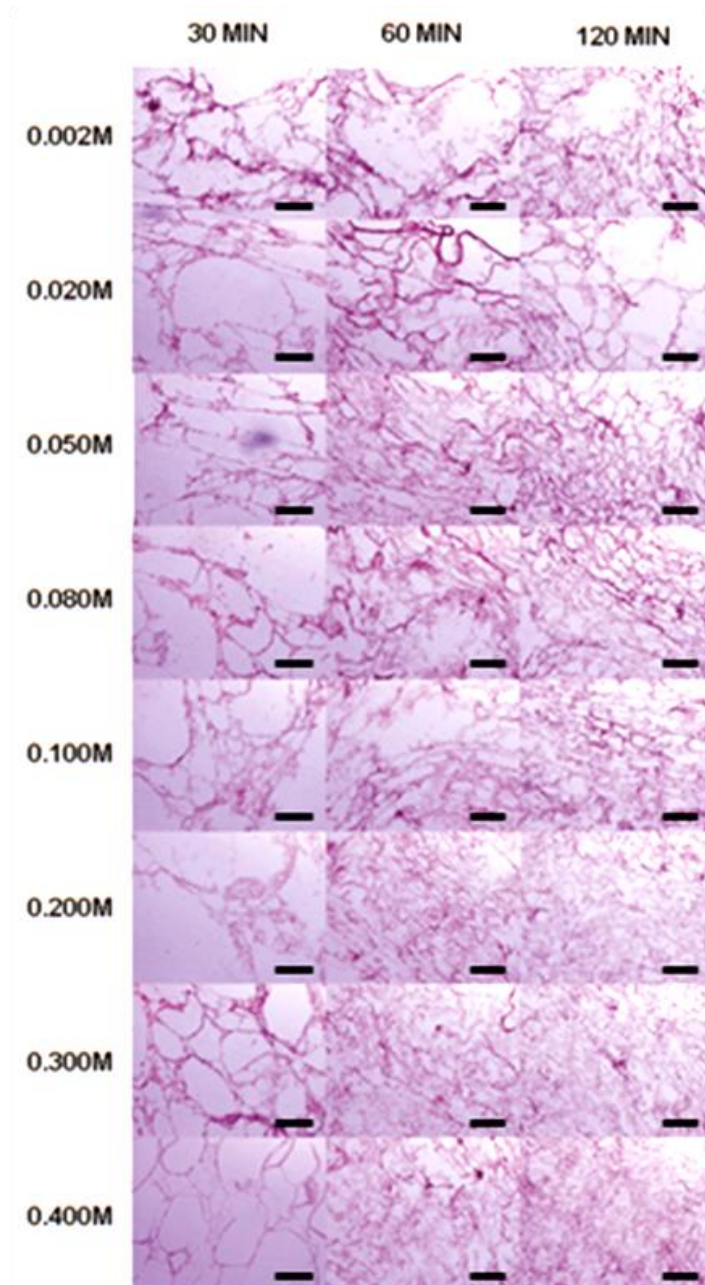


Figura 23. Análisis histológico de tejidos orales artificiales generados mediante ingeniería tisular y preincubados en diferentes concentraciones de glucosa durante 30, 60, y 120 minutos previamente a su procesamiento histológico inclusión en OCT. Tinción hematoxilina-eosina. Escala 1 μ m.

E. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE MUESTRAS PREINCUBADAS EN DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MALTOSA

Cuando los tejidos orales artificiales fueron incubados en diferentes soluciones de maltosa durante un tiempo de 30 minutos, encontramos adecuada consistencia de estos tejidos para concentraciones de maltosa de 0,080M, 0,100M, 0,200M, 0,300M y 0,400M, siendo menor para concentraciones inferiores de maltosa. En general, las muestras presentaron espacios interfibrilares de tamaño pequeño y medio, cuyas áreas oscilaron entre $91,8 \pm 74,2 \mu\text{m}^2$ y $9460,3 \pm 2899,3 \mu\text{m}^2$, y sus diámetros oscilaron entre $10,0 \pm 4,4 \mu\text{m}$ y $108,7 \pm 15,6 \mu\text{m}$, en un área y diámetro promedio de $3402,5 \pm 3724,2 \mu\text{m}^2$ y $51,2 \pm 34,5 \mu\text{m}$, respectivamente. La comparación estadística de las áreas y diámetros de los tejidos orales artificiales previamente tratados con maltosa durante 30 minutos con las muestras control reveló diferencias significativas para todos los tiempos de incubación ($p < 0,001$).

Cuando los tejidos artificiales se pretrataron con las diferentes soluciones de maltosa con un tiempo de 60 minutos, encontramos que la consistencia de los tejidos es adecuada cuando empleamos la maltosa a concentraciones de 0,080M, 0,100M, 0,200M, 0,300M y 0,400M, pero no cuando la concentración de la glucosa fue de 0,050M, 0,020M y 0,002M. El área y el diámetro promedios de los espacios encontrados en los tejidos artificiales fueron de $7771,8 \pm 7225,8 \mu\text{m}^2$ y $81,2 \pm 43,9 \mu\text{m}^2$ respectivamente. Estos espacios oscilaron, en las muestras incubadas en maltosa durante 60 minutos, entre $537,4 \pm 515,2 \mu\text{m}^2$ y $21923,7 \pm 14291,7 \mu\text{m}^2$ para el área y entre $23,9 \pm 11,3 \mu\text{m}$ y $158,2 \pm 56,1 \mu\text{m}$ para el diámetro. En comparación con las

muestras control, las diferencias fueron siempre estadísticamente significativas ($p < 0,001$).

Finalmente, cuando los tejidos orales artificiales fueron incubados en las diferentes soluciones de maltosa durante 120 minutos, la consistencia de los tejidos fue más alta que en aquellas muestras de tejidos que se incubaron durante 30 y 60 minutos. El área y el diámetro promedios de los espacios encontrados en la malla fibrilar de los tejidos incubados durante 120 minutos fue de $1432,5 \pm 1392,0 \mu\text{m}^2$ y $33,3 \pm 18,6 \mu\text{m}^2$, respectivamente, variando entre $135,5 \pm 178,4 \mu\text{m}^2$ y $4040,7 \pm 4776,3 \mu\text{m}^2$ para el área y entre $10,9 \pm 7,7 \mu\text{m}$ y $63,0 \pm 36,2 \mu\text{m}$ para el diámetro. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$) al comparar las muestras control con las muestras incubadas en concentraciones 0,002M, 0,020M, 0,050M y 0,080M de maltosa, pero no con aquellas muestras incubadas a más altas concentraciones de este azúcar (0,100M, 0,200M, 0,300M y 0,400M) ($p > 0,001$) (Tabla3).

Imágenes histológicas correspondientes al análisis de los tejidos orales artificiales previamente tratados con maltosa se ilustran en la Figura 24.

TIEMPO	CONCENTRACIÓN	ÁREA PROMEDIO (µm ²)	DIÁMETRO PROMEDIO (µm)	ÁREA D.E.	DIÁMETRO D.E.	ÁREA RELATIVA	DIÁMETRO RELATIVO	P ÁREA VS CONTROL	P DIÁMETRO VS CONTROL
30 min	0,002M	9460,3	108,7	2899,3	15,6	213,0	15,1	0,000	0,000
	0,020M	9081,7	92,7	12255,0	57,5	204,5	12,9	0,000	0,000
	0,050M	2255,6	44,6	3116,8	31,3	50,8	6,2	0,000	0,000
	0,080M	2004,3	45,1	1744,1	24,1	45,1	6,3	0,000	0,000
	0,100M	2006,5	50,1	555,7	7,3	45,2	7,0	0,000	0,000
	0,200M	2135,6	46,3	2138,0	25,3	48,1	6,4	0,000	0,000
	0,300M	184,9	12,6	274,7	9,2	4,2	1,8	0,000	0,000
0,400M	91,8	10,0	74,2	4,4	2,1	1,4	0,000	0,000	
60 min	0,002M	21923,7	158,2	14291,7	56,6	493,7	22,0	0,000	0,000
	0,020M	11254,2	109,2	12356,0	51,7	253,4	15,2	0,000	0,000
	0,050M	12612,3	107,7	16473,2	70,4	284,0	15,0	0,000	0,000
	0,080M	5277,4	77,2	3899,4	29,0	118,8	10,7	0,000	0,000
	0,100M	6833,9	85,0	5666,4	40,6	153,9	11,8	0,000	0,000
	0,200M	2367,2	50,2	2541,6	23,3	53,3	7,0	0,000	0,000
	0,300M	1368,4	38,9	1264,9	16,0	30,8	5,4	0,000	0,000
0,400M	537,4	23,9	515,2	11,3	12,1	3,3	0,000	0,000	
120 min	0,002M	4040,7	63,0	4776,3	36,2	91,0	8,7	0,000	0,000
	0,020M	2494,4	47,3	3358,3	32,3	56,2	6,6	0,000	0,000
	0,050M	2317,2	49,8	2341,6	22,9	52,2	6,9	0,000	0,000
	0,080M	1082,5	32,2	1335,7	19,4	24,4	4,5	0,000	0,000
	0,100M	835,9	29,5	808,6	14,8	18,8	4,1	0,063	0,063
	0,200M	376,7	21,0	224,9	6,6	8,5	2,9	0,035	0,035
	0,300M	177,3	13,1	197,2	7,8	4,0	1,8	0,063	0,063
0,400M	135,5	10,9	178,4	7,7	3,1	1,5	0,529	0,529	

Tabla 3.- Resultados del análisis histológico de muestras de tejido oral artificial preincubado en diferentes concentraciones de **glucosa** durante diferentes tiempos e incluidos en *OCT*. En diferentes columnas se muestra, para cada tiempo y concentración, el área media de los espacios interfibrilares de los tejidos incubados en los diferentes agentes y de los controles, el diámetro medio de dichos espacios, la desviación estándar (D.E.) de ambos parámetros, el área y el diámetro relativos (área o diámetro promedio obtenida con cada protocolo específico dividida entre el área o diámetro promedio del control positivo) y el valor de significación estadística p para la comparación del área o diámetro obtenido para cada protocolo concreto frente al área o diámetro del control positivo.

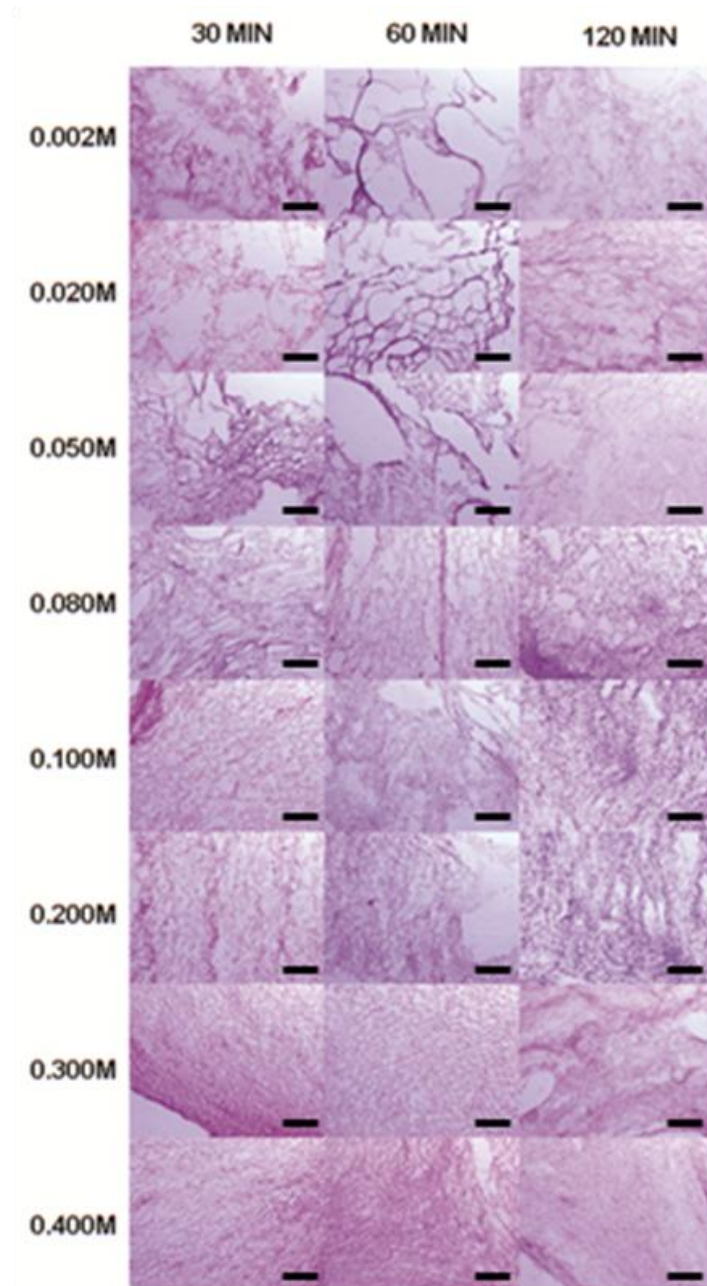


Figura 24. Análisis histológico de tejidos orales artificiales generados mediante ingeniería tisular y preincubados en diferentes concentraciones de maltosa durante 30, 60, y 120 minutos previamente a su procesamiento histológico inclusión en OCT. Tinción hematoxilina-eosina. Escala 1 μ m.

F. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE MUESTRAS PREINCUBADAS EN DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TREHALOSA

Los tejidos orales artificiales incubados en soluciones de trehalosa 0,002M y 0,020M durante 30 minutos mostraron baja consistencia al corte, siendo ésta inapropiada para la criosección de estos tejidos. Sin embargo, las muestras incubadas en trehalosa 0,050M, 0,080M, 0,100M, 0,200M, 0,300M y 0,400M durante 30 minutos, presentaron apropiada consistencia, pudiendo éstas ser procesadas en el criostato para su análisis histológico. En general, las muestras presentaron pequeños espacios entre las fibras de la malla de fibrina-agarosa, cuyo área media osciló entre $33,4 \pm 34,1 \mu\text{m}^2$ y $4394,4 \pm 6714,4 \mu\text{m}^2$ y cuyo diámetro medio varió entre $5,8 \pm 3,1 \mu\text{m}$ y $54,5 \pm 54,0 \mu\text{m}$. El área promedio fue $1069,4 \pm 1526,3 \mu\text{m}^2$ y su diámetro promedio fue $22,6 \pm 17,8 \mu\text{m}$ (Figura 5). Las comparaciones estadísticas entre el área y el diámetro de los tejidos orales artificiales previamente tratados con trehalosa durante 30 minutos frente a las muestras control no mostraron diferencias significativas para ninguna de las concentraciones de trehalosa analizadas ($p > 0,001$), excepto para 0,002M y 0,050M, en las que las diferencias fueron marginalmente significativas ($p = 0,001$).

Cuando los tejidos se incubaron en las diferentes soluciones de trehalosa durante 60 minutos, encontramos adecuada consistencia de los tejidos artificiales a la hora de realizar la criosección de las muestras para todas las concentraciones. El área y el diámetro promedios de los espacios interfibrilares encontrados en los tejidos artificiales fueron $1023,7 \pm 1316,7 \mu\text{m}^2$ y de $26,7 \pm 17,9 \mu\text{m}$, respectivamente, con un rango de entre $127,4 \pm 107,7 \mu\text{m}^2$ y $3758,3 \pm 4386,0 \mu\text{m}^2$ para el área y entre $11,8 \pm 5,2 \mu\text{m}$ y $60,3 \pm 35,7 \mu\text{m}$ para el diámetro. La comparación estadística entre las muestras

control y las muestras incubadas en trehalosa a 0,002M, y 0,020M demostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0,001$). Sin embargo, los valores medios de área y diámetro encontrados en los controles y en las muestras orales artificiales preincubadas en trehalosa durante 60 minutos fueron comparables a aquéllos de los controles incluidos en parafina ($p > 0,001$).

Finalmente, cuando los tejidos orales artificiales fueron incubados en las diferentes soluciones de trehalosa durante un tiempo de 120 minutos, observamos que la consistencia de todas las muestras fue alta, permitiendo su procedimiento mediante criosección. Sin embargo, esta consistencia fue demasiado alta cuando se utilizaron altas concentraciones de trehalosa, por lo que la criosección fue algo más difícil. El área y el diámetro promedios de los espacios observados en la malla de fibrina-agarosa de los tejidos artificiales incubados durante 120 minutos en trehalosa midieron $1224,2 \pm 1125,2 \mu\text{m}^2$ y $28,6 \pm 16,0 \mu\text{m}$ respectivamente, oscilando entre $21,9 \pm 10,8 \mu\text{m}^2$ y $3707,5 \pm 4988,5 \mu\text{m}^2$ para el área y para el diámetro $5,1 \pm 1,3 \mu\text{m}$ y $56,7 \pm 40,9 \mu\text{m}$ (Figura 5). Las diferencias con las muestras control fueron estadísticamente significativas para las concentraciones de trehalosa 0,002M, 0,020M, 0,080M y 0,200M ($p < 0,001$) y marginalmente significativas para 0,050M ($p = 0,001$). No se encontraron diferencias para el resto de las concentraciones de trehalosa (Tabla 4).

Algunos ejemplos del análisis histológico de tejidos orales artificiales previamente tratados con las diferentes soluciones de trehalosa se muestran en la Figura 25, mientras que los valores medios del área y el diámetro de los espacios interfibrilares obtenidos mediante el procesamiento de muestras en trehalosa, se muestran en las Figuras 26 y 27.

TIEMPO	CONCENTRACIÓN	ÁREA PROMEDIO (µm ²)	DIÁMETRO PROMEDIO (µm)	ÁREA D.E.	DIÁMETRO D.E.	ÁREA RELATIVA	DIÁMETRO RELATIVO	P ÁREA VS CONTROL	P DIÁMETRO VS CONTROL
30 min	0,002M	4394,4	54,5	6714,4	54,0	99,0	7,6	0,001	0,001
	0,020M	2005,6	38,9	2535,5	33,9	45,2	5,4	0,089	0,089
	0,050M	1392,6	34,3	1819,6	25,7	31,4	4,8	0,001	0,001
	0,080M	343,6	15,8	538,7	14,4	7,7	2,2	0,315	0,315
	0,100M	114,0	9,8	173,6	7,5	2,6	1,4	0,739	0,739
	0,200M	226,4	15,4	193,9	7,6	5,1	2,1	0,009	0,009
	0,300M	45,7	6,8	52,6	3,7	1,0	0,9	0,393	0,393
	0,400M	33,4	5,8	34,1	3,1	0,8	0,8	0,280	0,280
60 min	0,002M	3758,3	60,3	4386,0	35,7	84,6	8,4	0,000	0,000
	0,020M	2366,5	45,7	3311,3	32,0	53,3	6,3	0,000	0,000
	0,050M	497,1	23,3	453,1	10,1	11,2	3,2	0,004	0,004
	0,080M	364,0	17,3	472,6	13,5	8,2	2,4	0,035	0,035
	0,100M	448,9	19,5	589,6	14,6	10,1	2,7	0,029	0,029
	0,200M	338,0	19,8	203,7	6,5	7,6	2,8	0,075	0,075
	0,300M	127,4	11,8	107,7	5,2	2,9	1,6	0,043	0,043
	0,400M	289,6	16,1	377,3	11,0	6,5	2,2	0,023	0,023
120 min	0,002M	3707,5	56,7	4988,5	40,9	83,5	7,9	0,000	0,000
	0,020M	1039,2	31,1	1188,6	20,0	23,4	4,3	0,000	0,000
	0,050M	1191,0	28,9	2000,9	27,5	26,8	4,0	0,001	0,001
	0,080M	1435,1	38,6	1197,0	19,4	32,3	5,4	0,000	0,000
	0,100M	1197,5	26,3	2861,6	30,4	27,0	3,7	0,011	0,011
	0,200M	1044,3	31,7	1198,5	18,9	23,5	4,4	0,000	0,000
	0,300M	157,3	10,3	314,6	10,2	3,5	1,4	0,971	0,971
	0,400M	21,9	5,1	10,8	1,3	0,5	0,7	0,029	0,029

Tabla 3.- Resultados del análisis histológico de muestras de tejido oral artificial preincubado en diferentes concentraciones de **trehalosa** durante diferentes tiempos e incluidos en *OCT*. En diferentes columnas se muestra, para cada tiempo y concentración, el área media de los espacios interfibrilares de los tejidos incubados en los diferentes agentes y de los controles, el diámetro medio de dichos espacios, la desviación estándar (D.E.) de ambos parámetros, el área y el diámetro relativos (área o diámetro promedio obtenida con cada protocolo específico dividida entre el área o diámetro promedio del control positivo) y el valor de significación estadística p para la comparación del área o diámetro obtenido para cada protocolo concreto frente al área o diámetro del control positivo.

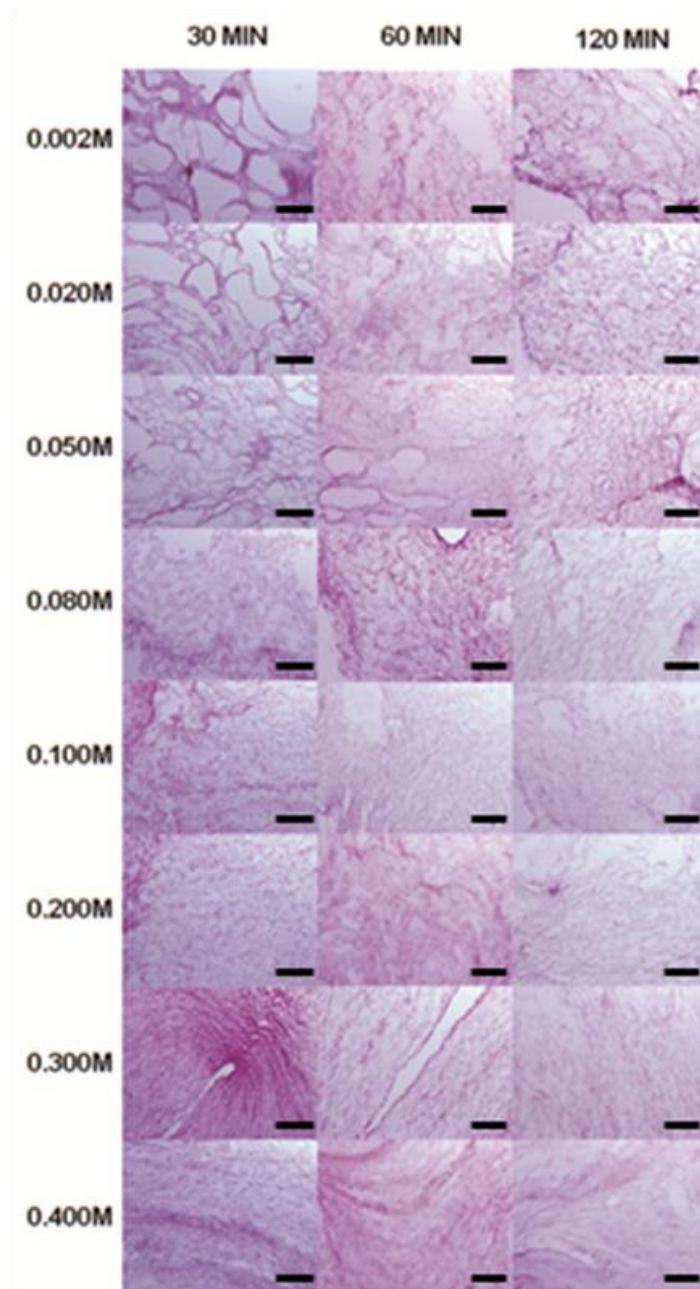


Figura 25. Análisis histológico de tejidos orales artificiales generados mediante ingeniería tisular y preincubados en diferentes concentraciones de **trehalosa** durante 30, 60, y 120 minutos previamente a su procesamiento histológico inclusión en *OCT*. Tinción hematoxilina-eosina. Escala 1 μ m.

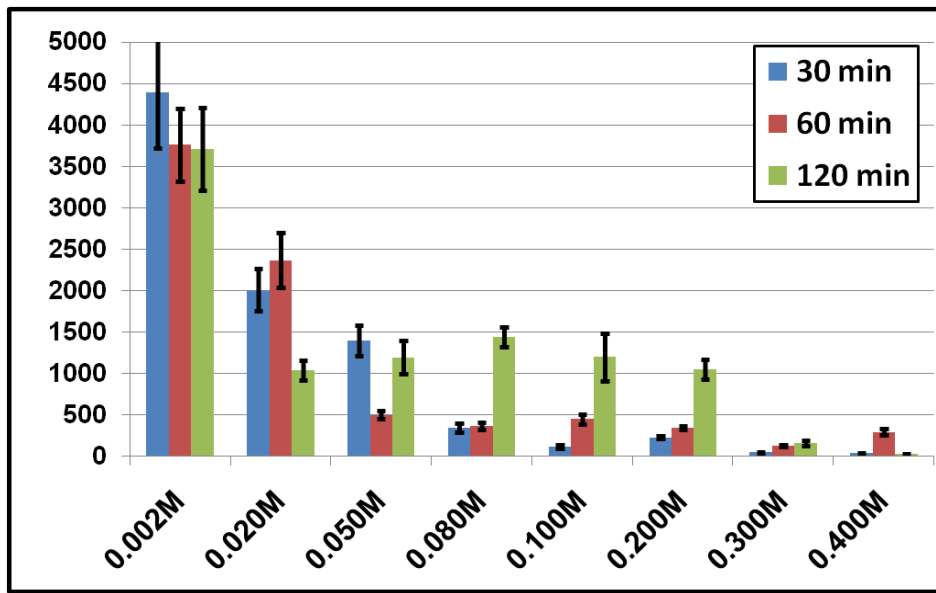


Figura 26. Histograma en el que se representa el área promedio de los tejidos orales artificiales preincubados en diferentes concentraciones de trehalosa durante 30, 60, 120 minutos. Las barras negras corresponden a los errores estándar.

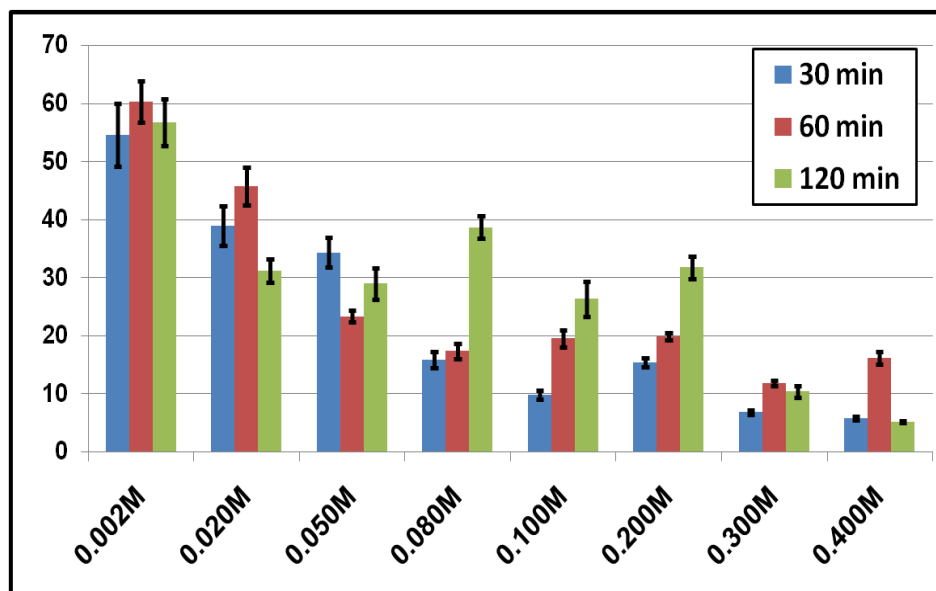


Figura 27. Histograma en el que se representa el diámetro promedio de los tejidos orales artificiales preincubados en diferentes concentraciones de trehalosa durante 30, 60, 120 minutos. Las barras negras corresponden a los errores estándar.

DISCUSIÓN

La construcción de tejidos humanos artificiales mediante ingeniería tisular es una nueva disciplina biomédica que permite el desarrollo *in vitro* de diferentes tipos de tejidos humanos de utilidad clínica potencial. Entre otros, diferentes investigaciones previamente lograron crear en laboratorio sustitutos tisulares de mucosa oral (Sánchez-Quevedo *et al.*, 2007; Alaminos *et al.*, 2007; Garzón *et al.*, 2009-1 y 2009-2), córnea (Alaminos *et al.*, 2006; González-Andrades *et al.*, 2009), piel (Llames *et al.*, 2004; Meana *et al.*, 2000), cartílago (Koelling and Miosge 2009), hueso (Sundelacruz *et al.*, 2009) y músculo (Tedesco *et al.*, 2010) utilizando diferentes biomateriales como sustitutos estromales.

En este contexto, una parte importante del proceso de evaluación y control de calidad de los tejidos artificiales generados en el laboratorio es el análisis histológico de dichos tejidos. De hecho, el análisis histológico es uno de los procedimientos de control que se deben realizar en todos los tejidos generados en el laboratorio, previamente a su implante clínico (Proussaefs *et al.*, 2002). Sin embargo, la mayor parte de los métodos y técnicas histológicas utilizados clásicamente aún debe adaptarse y optimizarse para su utilización sobre tejidos artificiales desarrollados en el laboratorio mediante ingeniería tisular, puesto que la estructura, la consistencia y la composición química de estos tejidos artificiales es muy diferente de la que presentan los tejidos humanos nativos.

A este respecto, una de las técnicas más utilizadas para una rápida evaluación estructural de los tejidos humanos nativos, así como para ciertos análisis en los que se desea preservar fielmente la composición química y antigénica de los tejidos, es el procesamiento de tejidos en criostato utilizando OCT como agente crioprotector (Hippe-Sanwald, 1993; Dahl and Staehelin 1989; Naber *et al.*, 1992; Rahimi *et al.*, 2006). Esta técnica, sin embargo, puede resultar difícil incluso para los histólogos más experimentados (Franks, 1998), especialmente en aquellos tejidos que presentan baja consistencia tras la congelación y en los tejidos muy ricos en agua. En lo que respecta

a los tejidos artificiales, hasta el momento no existe ningún trabajo relacionado con el procesamiento de muestras tisulares humanas artificiales utilizando técnicas de criosección o crioprotección, existiendo gran carencia de información relacionada con el uso de técnicas clásicas tales como la inclusión de tejidos en *OCT* y su criosección aplicadas sobre tejidos humanos artificiales. Por esta razón, en esta Tesis Doctoral hemos realizado un análisis para evaluar la capacidad de ciertos agentes crioprotectores a la hora de preservar la estructura de los tejidos sometidos a crioprocesamiento y criosección para evaluación histológica estándar utilizando hematoxilina y eosina. Las ventajas de estas técnicas son innumerables, destacando la rapidez del procesamiento, lo cual permite realizar incluso diagnósticos histológicos intraoperatorios (Dahl and Staehelin, 1989). Sin embargo, la aplicación de esta técnica (inclusión en *OCT* y sección en criostato) a las muestras artificiales basadas en biomateriales de fibrina y agarosa reveló la existencia de grandes artefactos, existiendo espacios interfibrilares significativamente mayores que los que se apreciaron en los controles positivos tratados según técnica convencional de fijación en formol e inclusión en parafina. De hecho, el área promedio de los espacios interfibrilares de los tejidos orales artificiales fue 192,7 mayor que el área encontrada en las muestras control, siendo el diámetro promedio 13,3 veces superior.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de ciertos agentes químicos de carácter volátil, ácidos y aldehidos para mantener la estructura del tejido artificial una vez congelado para criosección, siendo todos ellos, agentes fijadores de uso común en histología y en bancos de tejidos (Holund *et al.*, 1981; Baum *et al.*, 1994). Los resultados mostraron que las muestras presentaban consistencia y estructura inapropiadas, con el desarrollo de grandes espacios entre las fibras de la malla de fibrina-agarosa derivadas de la formación de grandes cristales de hielo, los cuales no existían en las muestras control incluidas en parafina (controles positivos). Estos resultados sugieren que el uso de estos compuestos químicos como agentes

crioprotectores no es apropiado para el procesamiento de los tejidos artificiales en el criostato, asociándose su uso a la aparición de artefactos significativos a nivel de la estructura histológica de estos tejidos generados mediante ingeniería tisular.

En cambio, el uso de diversos tipos de hidratos de carbono como agentes crioprotectores, incluyendo la glucosa (un azúcar de estructura monomérica), la maltosa y la trehalosa (dímeros formados cada uno de ellos por dos moléculas de glucosa), se asoció a mejores niveles de consistencia de los tejidos artificiales y a una adecuada preservación de la estructura de los tejidos una vez procesados en el criostato, especialmente cuando se utilizaron ciertas concentraciones y ciertos tiempos de incubación de estos hidratos de carbono. Estos resultados coinciden con algunos trabajos previos que utilizaron diversas soluciones crioprotectoras (Naber *et al.*, 1992; Loken and Demetrick, 2005), especialmente sacarosa (Ljungberg and Johansson, 1993; Whintlon *et al.*, 2001) y trehalosa (Norville *et al.*, 2007) para la criofijación de muestras de tejidos nativos.

La trehalosa es un disacárido de la glucosa de origen natural con propiedades terapéuticas, que protegen la integridad de las células frente a la desecación, deshidratación y calor o frío extremo (Deb, 2009). Sirve como fuente energética en bacterias, levaduras, hongos, insectos e invertebrados y en levaduras y plantas como molécula de señalización o controlador metabólico. Se ha demostrado que la trehalosa puede proteger a las proteínas y a las membranas celulares de la inactivación y desnaturalización causada por una variedad de condiciones, como la desecación, deshidratación, calor, frío y oxidación (Deb, 2009). Por último, en miobacterias y corinebacterias, la trehalosa es un componente integral de los glucolípidos, que son importantes estructuras de la pared celular (Elbein *et al.*, 2003). Se ha descrito que esta sustancia tiene una notable capacidad para estabilizar las membranas y proteínas en estado seco. A raíz de esto, se ha considerado a la trehalosa como un protector universal y coligado químico (Crowe, 2007; Crowe *et al.*, 2001). Las células de

mamíferos pueden ser protegidas empleando trehalosa, para mantener su viabilidad en ausencia de agua. Este estudio se realizó en subcultivos primarios de fibroblastos humanos que se mantuvieron en estado seco por más de cinco días (Guo *et al.*, 2000).

La trehalosa, según Deb (2009), es un crioprotector natural y bioconservante con un potencial para mejorar la criopreservación y almacenamiento de células troncales humanas embrionarias y algunos tipos de células somáticas. Por otro lado, cuando se evaluó la eficacia de la trehalosa para la congelación en seco de la membrana amniótica para la reconstrucción de la superficie ocular, se encontró que la trehalosa conservó las características físicas, biológicas y morfológicas de la membrana amniótica en comparación con aquellas muestras sometidas a congelación sin utilizarla. Por lo tanto, el tratamiento de las muestras con la trehalosa al 10% para su congelación en seco, ha sugerido ser altamente útil como biomaterial para la reconstrucción de la superficie ocular (Nakamura *et al.*, 2008).

Otros trabajos han demostrado que la trehalosa puede ser eficaz en el tratamiento de síndromes de sequedad de ojos o sequedad de piel en seres humanos (Matsuo, 2001; Norcia, 2000).

Higashiyama (2002) sugiere que la trehalosa suprime el daño de radicales libres, protege contra la anoxia, inhibe la caries dental y realza la producción del etanol durante la fermentación. Además, diversos autores indican que la trehalosa inhibe la reabsorción ósea en ratones sometidos a ovariectomía aparentemente por la supresión de la diferenciación de células osteoclasticas, sugiriendo que la trehalosa puede ser usada como tratamiento de osteoporosis en seres humanos (Benaroudj *et al.*, 2001; Garg *et al.*, 2002). Recientemente, Tanaka *et al.*, han mencionado que la trehalosa se podría utilizar para inhibir la acumulación de la proteína asociada con la enfermedad de Huntington's, la cual fue probada en un modelo *in vivo*.

Por otro lado, la liofilización de bacterias crioprotectadas con trehalosa, mostró una notable supervivencia inmediatamente después de la desecación-congelación. Además las bacterias deshidratadas con trehalosa conservaron una alta viabilidad después de la exposición al aire húmedo. Por el contrario, cuando las bacterias fueron liofilizadas con sacarosa, mostraron una supervivencia inicial más baja y al exponerlas al aire húmedo su viabilidad disminuyó rápidamente (Leslie *et al.*, 1995).

Sun *et al.* y Crowe *et al.*, emplearon trehalosa en liposomas, para analizar su estabilidad a largo plazo. En este estudio, los liposomas secos expuestos a una humedad incrementada perdieron rápidamente su contenido cuando se desecaron con sacarosa, pero no cuando fueron desecados con trehalosa.

Por otro lado, Wolkers *et al.*, han reportado que al utilizar la trehalosa en plaquetas sometidas a desecación por congelación, logran una estabilidad de las mismas en más del 90% (Wolkers *et al.*, 2001). Actualmente, las plaquetas son almacenadas a temperatura ambiente en un banco de sangre por un periodo máximo de 3 a 5 días, tiempo después del cual son desechadas (Tablin *et al.*, 1996; Tsverkova *et al.*, 2004). Sin embargo, las plaquetas que han sido desecadas por congelación presentan características interesantes para su uso terapéutico cuando se utiliza trehalosa como agente protector, que evita su degradación al momento de su rehidratación:

- Las plaquetas en este estado seco son estables por lo menos durante 2 años cuando se almacenan a temperatura ambiente al vacío.
- Las plaquetas sometidas a desecación por congelación no presentan una morfología parecida a las plaquetas en estado fresco, pero tienen la capacidad de generar respuestas para la trombina, ADP, colágeno y ristocetin.
- Las plaquetas rehidratadas no son del todo perfectas, pero exhiben una regulación sorprendentemente buena para algunos elementos clave

relacionados con las funciones celulares, tales como la regulación del calcio intracelular (Auh *et al.*, 2004).

En base a los estudios antes mencionados, se han sugerido tres hipótesis del mecanismo crioprotector de la trehalosa (Crowe *et al.*, 1984):

- 1.) La primera hipótesis sugiere que los azúcares pueden sustituir las moléculas del agua formando puentes de hidrógeno con los residuos polares, estabilizando la estructura en la ausencia de agua (Crowe *et al.*, 1998, 2001; Allison *et al.*, 2000; Cleland *et al.*, 2000).
- 2.) Otra hipótesis sugiere que los azúcares concentran las moléculas de agua cerca de la superficie de las membranas celulares y, de esta forma, éstos se preservan (Belton *et al.*, 1994; Cottone *et al.*, 2002).
- 3.) La hipótesis de la vitrificación, sugiere que los azúcares forman cristales amorfos, así, las fluctuaciones estructurales se reducen (Sun *et al.*, 1996, 1997).

A consecuencia de estas tres hipótesis, se ha sugerido que la vitrificación puede ocurrir simultáneamente con interacciones directas entre el azúcar y los residuos polares. La interacción directa, por otro lado, ha sido comprobada a través de técnicas físicas, incluyendo espectroscopia infrarroja, resonancia nuclear magnética y rayos X (Crowe *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1986; Ricker *et al.*, 2003). Según Chandrasekhar, la trehalosa puede lograr conformaciones energéticamente estables con fosfolípidos, enlazando tres fosfolípidos en un medio seco. Simultáneamente, se han estudiado algunas interacciones entre proteínas y la trehalosa con resultados similares (Cottone *et al.*, 2002; Lins *et al.*, 2004).

Uno de los primeros modelos referentes a la preservación de componentes membranosos celulares animales empleando trehalosa y otros azúcares, fue el retículo sarcoplasmático aislado del músculo de la langosta (Crowe *et al.*, 1987).

En este estudio, la trehalosa mostró ser indiscutiblemente superior al resto de los azúcares probados para preservar estas membranas. Sin embargo, se sugirió posteriormente que otros azúcares tales como sacarosa pudieran preservar las membranas en concentraciones similares a las de la trehalosa (Crowe and Crow 1992).

Durante la rehidratación de las membranas criodesecadas es un paso clave del proceso, habiéndose demostrado que, el paso de los fosfolípidos a través de esta fase, puede debilitar la doble capa de la membrana. Estos efectos fueron hallados primeramente con la trehalosa (Crowe *et al.*, 1992).

Cuando se compararon los efectos de la fase de transición durante la hidratación con otros azúcares y otros polímeros criopreservantes, se encontró que a bajas temperaturas la fase de transición durante la hidratación de vesículas lipídicas, fue significativamente superior en comparación con la trehalosa. Otros azúcares, particularmente los disacáridos, estabilizaron de forma eficiente las vesículas. Sin embargo, cuando se mejoró la técnica de deshidratación en frío, las diferencias en la fase de transición entre los disacáridos tendieron a desaparecer, aunque la trehalosa fue significativamente más efectiva a bajas concentraciones. Aparentemente, la habilidad para preservar liposomas en estado seco está restringida a los disacáridos. Se ha encontrado que la trehalosa se puede introducir en el citoplasma de la célula, siempre y cuando la célula tenga una fase líquida endocítica funcional (Crowe, 2007).

Otros trabajos han estudiado el efectos de diversos agentes crioprotectores para emplearlos en el proceso de vitrificación de células endoteliales de algunos tejidos, entre otros los de la córnea (CECs) (Fan *et al.*, 2009). Para este estudio, emplearon

CECs de bovinos, aislándolas y sometidas al protocolo de vitrificación, intentando probar lo más sistemáticamente posible los agentes crioprotectores (CPAs). Los componentes CPAs fueron de tres tipos, por ejemplo, para la absorción de los CPAs emplearon azúcares (xilosa, fructosa, manosa, glucosa, maltosa, sacarosa y trehalosa) y componentes macromoleculares (Sulfóxido de dimetilo, etilenglicol (EG), 1,2-propanodiol, 2,3-butanodiol, acetamida y éter monometílico de etilenglicol), evaluando su viabilidad con la prueba del azul tripan. Ficoll (MW 7kDa), dextrano (MW 7kDa), condroitín sulfato (CS, MW 18-30kDa), albúmina sérica bovina (68kDa MW) y glicol de polietileno (MW 6kDa, 10kDa y 20kDa) fueron elegidos como los compuestos macromoleculares. Como muestras control emplearon CECs sometidas a congelación. Los resultados mostraron que el etilenglicol, la glucosa y el condroitín sulfato fueron los mejores agentes crio-protectores. Las concentraciones en las soluciones del protocolo de vitrificación se adecuaron a cada uno de los componentes siendo de etilenglicol al 52% (w/w), glucosa al 8% (w/w) y condroitín sulfato al 3% (w/w). La tasa de supervivencia de CECs fue de $89,4 \pm 2,1\%$ (media \pm SD) obtenida mediante esta fórmula. De esta manera se estableció que el protocolo de vitrificación era semejante al compararlas con las muestras (CECs) control sometidas a congelación.

Por otro lado, los resultados de esta Tesis Doctoral demostraron que la preincubación de los tejidos humanos orales artificiales en soluciones de glucosa durante diferentes tiempos, no resulta en una adecuada preservación de la estructura de los tejidos. En general, las muestras preincubadas en glucosa mostraron una desestructuración parcial, existiendo grandes espacios entre las fibras de la matriz de fibrina-agarosa y un gran número de artefactos en las preparaciones observadas bajo el microscopio. En todos los casos analizados, el tamaño (área y diámetro) de estos artefactos fue significativamente superior al de las muestras utilizadas como controles positivos. Por tal motivo, podemos afirmar que el uso de este oligosacárido no es adecuado como

agente crio-protector previo a la colocación del OCT, fijación con nitrógeno líquido y criosección de tejidos orales artificiales.

En esta misma línea, el uso de soluciones de maltosa como agente crioprotector de las estructuras de los tejidos artificiales, revelaron que ciertas concentraciones y tiempos de incubación fueron capaces de proteger eficazmente los tejidos artificiales frente a los artefactos de la congelación, no existiendo diferencias significativas respecto a las muestras sometidas a técnicas consideradas *gold-standard* tales como la fijación en formol y la inclusión en parafina, aunque esto sólo ocurría para ciertas concentraciones de maltosa y para ciertos periodos de tiempo. Concretamente, los tejidos orales artificiales preincubados en soluciones de maltosa 0,300M y 0,400M, durante 30 minutos, resultó en la aparición de espacios intercelulares cuyas áreas promedio eran de 2 a 4 veces más grandes que las encontradas en las muestras control (tejidos incluidos en parafina), siendo los diámetros alrededor de 1,5 veces mayores que las del control. Estos valores eran claramente más bajos que los obtenidos cuando las muestras no eran preincubadas en ningún agente crioprotector previamente a su inclusión en OCT, en las que el área podía llegar a ser hasta 200 veces mayor que en las muestras control, y el diámetro hasta 15 veces superior. De hecho, el análisis estadístico reveló que las diferencias de estas muestras preincubadas en maltosa respecto al control no fueron significativas para ciertas concentraciones y periodos de tiempo.

En cambio, cuando los tejidos artificiales fueron incubados en maltosa durante un tiempo de 60 minutos, encontramos diferencias estadísticamente significativas en todas las concentraciones, al compararlas con las muestras control, lo cual sugiere que los artefactos generados eran significativamente mayores que los que aparecían en los controles embebidos en parafina.

Finalmente, las muestras de tejidos orales artificiales previamente tratadas con maltosa 0,100M, 0,200M, 0,300M, 0,400M e incubadas durante un tiempo de 120 minutos, no revelaron diferencias significativas frente a las muestras control, por lo que el tamaño de los espacios interfibrilares era similar. De todas las concentraciones de maltosa, la concentración 0,400M mostró pequeños espacios interfibrilares con un área promedio de 3,1 veces el área del grupo control y con un diámetro 1,5 veces mayor que el encontrado en los controles. Por tal motivo, concluimos que el mejor resultado utilizando la maltosa como agente crioprotector de muestras de tejidos orales artificiales, se obtuvo a concentraciones de 0,400M durante un tiempo de incubación del tejido de 120 minutos, por lo menos para la clase de tejidos usados en este trabajo (pequeños trozos de andamios de fibrina-agarosa).

El tercer hidrato de carbono cuya capacidad como agente crioprotector se evaluó en esta Tesis Doctoral fue la trehalosa. Como se indicó previamente, la trehalosa se encuentra en diversas especies con alta capacidad de supervivencia ante la deshidratación y desecación, y se ha demostrado que este hidrato de carbono puede conferir resistencia a la desecación y a la congelación de células de mamíferos (Guo *et al.*, 2000; Crowe *et al.*, 2001). Por todo ello, diversos investigadores han empleado este hidrato de carbono dimérico para la crioprotección de muestras cristalográficas que se someterán al crioseccionamiento para su análisis mediante microscopía electrónica (Nakamara *et al.*, 2008).

En vista de los antecedentes hasta ahora mencionados, en esta Tesis Doctoral quisimos evaluar la capacidad de la trehalosa como agente crioprotector en muestras tisulares artificiales procesadas a bajas temperaturas, hipotetizando que la trehalosa y otros hidratos de carbono relacionados podrían proteger los tejidos artificiales frente a la criosección, además de mejorar la calidad biológica de los tejidos analizados.

Nuestros resultados demostraron que la incubación de los tejidos artificiales durante 30 minutos en todas las concentraciones de trehalosa, derivó en una buena calidad del tejido artificial crioseccionado y procesado histológicamente, especialmente a concentraciones altas de trehalosa. De hecho, la comparación estadística de los espacios interfibrilares de las muestras control y de las muestras incubadas en trehalosa durante 30 minutos no demostró diferencias significativas, sugiriendo que la calidad de ambos tipos de tejidos fue similar. Sorprendentemente, las muestras de tejidos incubadas durante 30 minutos a una concentración de trehalosa a 0,300M presentaron espacios interfibrilares cuyo área y diámetro fueron muy similares a los de las muestras control embebidas en parafina (no se encontraron diferencias en el área; sin embargo, el diámetro de los tejidos previamente tratados con trehalosa fue 0,9 veces el diámetro de los controles). Además, la utilización de trehalosa a concentración 0,400M resultó en una adecuada calidad de las muestras analizadas, siendo las áreas y los diámetros de estas muestras 0.8 veces el área y el diámetro de las muestras control. Sin embargo, cuando los tejidos se preincubaron en soluciones de trehalosa 0,002M, 0,020M, durante 60 minutos, encontramos diferencias estadísticamente significativas en comparación con las muestras control, demostrando que a estas concentraciones, no es adecuado emplear trehalosa para tejidos artificiales a procesar mediante criostato.

Finalmente, es importante destacar que los resultados de los tejidos previamente tratados con trehalosa durante 120 minutos dieron lugar a resultados heterogéneos, encontrándose los mejores resultados con la utilización de soluciones de trehalosa 0,300M y 0,400M. El pretratamiento de los tejidos artificiales con trehalosa 0,400M durante 120 minutos podía ejercer funciones crioprotectoras eficientes, siendo el área y el diámetro de los espacios interfibrilares encontrados en los tejidos, incluso más pequeños que los espacios que se observaron al emplear técnicas clásicas de inclusión en parafina. Debido a que las muestras no fueron fijadas previamente a la

inclusión en *OCT*, proponemos la fijación de estos tejidos inmediatamente después de ser seccionados, utilizando para ello formol, alcohol o metacarn, por ejemplo.

Puesto que los resultados obtenidos con el uso de concentraciones de trehalosa a 0,300M y 0,400M fueron muy adecuados incluso para tiempos cortos, podemos sugerir que la técnica de elección a la hora de crioproteger un tejido artificial de fibrina y agarosa para su procesamiento en criostato podría ser la preincubación en trehalosa 0,300M ó 0,400M durante 30 minutos previamente a su inclusión en *OCT*. Además, la preincubación de los tejidos artificiales en trehalosa 0,400M durante 120 minutos, puede incluso mejorar la calidad de los tejidos al compararlos con las muestras control incluidas en parafina. Por todas estas razones, podríamos recomendar la utilización de alguna de estas concentraciones en muestras de tejidos artificiales humanos previamente a su inclusión en *OCT* y su procesamiento en criostato.

CONCLUSIONES

1. La utilización de los métodos y técnicas de ingeniería tisular desarrollados y optimizados en la presente Tesis Doctoral permitió generar tejidos orales artificiales basados en biomateriales de fibrina y agarosa útiles para la evaluación de protocolos de criofijación y procesamiento histológico.
2. La evaluación histológica de los tejidos orales artificiales criopreservados con acetona, glutaraldehído, formaldehído y ácido acético glacial y procesados mediante corte histológico en criostato, pone de relieve la existencia de artefactos estructurales significativos que invalidan su utilización en protocolos de ingeniería tisular.
3. La evaluación histológica de los tejidos orales artificiales criopreservados con glucosa y procesados mediante corte histológico en criostato, pone de relieve la existencia de artefactos estructurales que invalidan su utilización en protocolos de ingeniería tisular, especialmente cuando se utilizan tiempos cortos de incubación y concentraciones bajas.
4. La evaluación histológica de los tejidos orales artificiales criopreservados con maltosa y procesados mediante corte histológico en criostato, pone de relieve una preservación de los patrones histológicos, comparables a los que se obtienen tras la inclusión en parafina, cuando el periodo de incubación es de 120 minutos y los niveles de concentración oscilan en un rango entre 0,100 a 0,400 M, lo que convierte a la maltosa en estas condiciones en un agente criopreservante susceptible de utilizarse en protocolos de ingeniería tisular.
5. La evaluación histológica de los tejidos orales artificiales criopreservados con trehalosa y procesados mediante corte histológico en criostato, pone de relieve una preservación de los patrones histológicos, comparables a los que se obtienen tras la inclusión en parafina, para todas las concentraciones y tiempos a excepción de las concentraciones más bajas (0,002 y 0,020 M), lo que convierte a la trehalosa en estas condiciones en

un agente criopreservante susceptible de utilizarse en protocolos de ingeniería tisular.

6. La evaluación comparada de todos los agentes estudiados nos permiten proponer a la trehalosa a concentraciones 0,300 y 0,400M como el agente criopreservante mas eficaz de los tejidos orales artificiales procesados a temperaturas inferiores a 0°C. Al no ejercer el tiempo de incubación ningún papel fundamental en relación con estas concentraciones, se postula la utilización de un tiempo corto de incubación (30 minutos) con carácter previo a la inclusión de los tejidos orales artificiales de acuerdo con el protocolo establecido en la presente Tesis Doctoral.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

Alaminos M., Sanchez-Quevedo M.C., Munoz-Avila J.I., Serrano D., Medialdea S., Carreras I., Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006; 47: 3311-3317.

Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Muñoz-Ávila JI, García JM, Crespo PV, González-Andrades M, Campos A. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *Journal of Cell Physiology*. 2007; 211(3):692-698.

Alaminos M., Garzon I., Sánchez-quevedo M.C., Moreu G., González-Andrades M., Fernández-Montoya A. and Campos A. Timecourse study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J. Tissue Eng. Regen.Med*. 2007; 1: 350-359.

Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae SK, Kittappa R, McKay RD. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature*. 2006; 442(7104): 823-826.

Baust J.G. The freeze tolerance oxymoron. *Cryo-Lett.*1991; 12: 1-2.

Barthel L.K. and Raymond P.A. Improved method for obtaining 3-microns cryosections for immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 1990; 38: 1383-1388

Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol*. 2007; Dec. 213(3):565-73.

Bingler MA, Feingold B, Miller SA, Quivers E, Michaels MG, Green M, Wadowsky RM, Rowe DT, Webber SA. Chronic high Epstein-Barr viral load state and risk for late-onset posttransplant lymphoproliferative disease/lymphoma in children. *Am J Transplant*. 2008; 8(2): 442-445.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994; 331(14): 889-895.

Bruder S.P., Fox B.S. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1999; S: 68-83.

Boland E.D., Telemeco T.A., Simpson D.G., Wnek G.E. and Bowlin G.L. Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly (glycolic acid) for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2004; 71: 144-152.

Campos A. Cuerpo, *Histología y Medicina. De la descripción microscópica a la Ingeniería Tisular. Discurso de Ingreso en la Real Academia Nacional de Medicina.* Madrid 2004.

Cao YX, Chian RC. Fertility preservation with immature and vitro matured oocytes. *Semin Reprod Med.* 2009; Nov. 27(6): 456-464

Chen J, Li Q, Xu J, *et al.* Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artificial Organs.* 2005; 29: 104-113.

Christ G, Andersson KE, Atala A. The future of bladder research: molecular profiling, new drug targets, gene therapy, and tissue engineering. *Curr Urol Rep.* 2007; Mar. 8(2): 95-99.

Chiu KY, Loke SL, Ho FC. Immunohistochemical demonstration of c-erbB-2 oncoprotein in gastric adenocarcinoma: comparison of cryostat and paraffin wax sections and effect of fixation. *J Clin Pathol.* 1994; Feb. 47(2): 117-21.

Churchill T.A. and Storey K.B. Natural freezing survival by painted turtles. *Chrysemys picta marginata and C. picta bellii. Am J. Physiol.* 1992; 261, R626-R632.

Constanzo J.P., Baker P.J., Dinkelacker S.A. and Lee R.E.Jr. Endogenous and exogenous ice-nucleating agents constrain supercooling in the hatchling painted turtles. *J. Exp. Biol.* 2003; 206, 477-485.

Dahl R, Staehelin LA. High-pressure freezing for the preservation of biological structure: theory and practice. *J Electron Microscop Tech.* 1989; Nov. 13(3): 165-74.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292(5819): 154-156.

Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, Penn R, Starr P, VanHorne C, Kott HS, Dempsey PK, Fischman AJ, Raineri R, Manhart C, Dinsmore J, Isacson O. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant.* 2000; 9(2): 273-278.

Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 1: 102.

Franks J.W. A precision machine for mounting tissue for Mohs micrographic surgery. *Dermatol.Surg*. 1998; 24, 989-993.

Frantz GD, Pham TQ, Peale FV Jr, Hillan KJ. Detection of novel gene expression in paraffin-embedded tissues by isotopic in situ hybridization in tissue microarrays. *J. Pathol*. 2001; Sep. 195(1): 87-96.

Fryer JP. The current status of intestinal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008; 13(3): 266–272.

Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Jaranay M, González-Andrades M, Montalvo A, Campos A, Alaminos M. In vitro and vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J Periodontal Res*. 2009; 44(5): 588-97.

Garzón I (1), Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Jaranay M, González-Andrades M, Montalvo A, Campos A, Alaminos M. *Ex vivo* and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *Journal of Periodontal Research*. 2009; 44(5): 588-597.

Garzón I (2), Serrato D, Roda O, Sánchez-Quevedo MC, González-Jaranay M, Moreu G, Nieto-Aguilar R, Alaminos M, Campos A. *Ex vivo* cytokeratin expression profiling of human oral mucosa substitutes developed by tissue engineering. *International Journal of Artificial Organs*. 2009; 32(10): 711-719.

Geffre CP, Margolis DS, Ruth JT, DeYoung DW, Tellis BC, Szivek JA. A novel biomimetic polymer scaffold design enhances bone ingrowth. *J Biomed Mater Res A*. 2009; Dec. 91 (39): 795-805

Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*. 2004; 427(6970): 148-154.

Gómez de Ferraris, ME y Campos Muñoz, A. *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental*. Editorial: Médica Panamericana. Madrid, 2009. 3ª Edición.

González-Andrades M, Garzón I, Gascón MI, Muñoz-Avila JI, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009; Aug. 3(6): 442-449.

Grodzinski P, Silver M, Molnar LK. Nanotechnology for cancer diagnostics: promises and challenges. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006; 6(3): 307-318.

Hippe-Sanwald S. Impact of freeze substitution on biological electron microscopy. *Microsc Res Tech*. 1993; Apr.1; 24(5): 400-22.

Hutmacher, D. W., J. C. Goh, *et al*. "An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications." *Ann Acad Med Singapore*. 2001; 30(2): 183-191.

Ionescu AM, Cardona JC, González-Andrades M, Alaminos M, Campos A, Hita E, Pérez MM. UV Absorbance of a Bioengineered Corneal Stroma Substitute in the 240-400nm Range. *Cornea*. En prensa.

Jack R. Layne, Jr., Richard E. Lee, Jr. Adaptations of frogs to survive freezing. *Climate Research* 1995; 5: 53-59.

Kamoun M. Mechanisms of chronic allograft dysfunction. *Ther Drug Monit*. 2006; 28(1): 14-18.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993; 260 (5110): 920-926.

Lewis F, Maughan NJ, Smith V, Hillan K, Quirke P. Unlocking the archive-gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol*. 2001; Sep. 195(1): 66-71.

Li W.J., Laurencin C.T., Caterson E.J., Tuan R.S. and Ko F.K. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res*. 2002; 60: 613-621.

Llames SG, Del Rio M, Larcher F, *et al*. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation*. 2004; 77: 350-355.

Llames S, García E, García V, del Río M, Larcher F, Jorcano JL, López E, Holguín P, Miralles F, Otero J, Meana A. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank*. 2006; 7(1): 47-53.

Lokan SD, Demetrick DJ. A novel method for freezing and storing research tissue bank specimens. *Human Pathol*. 2005; Sep. 36 (9); 977-980.

Lundheim R, Zachariassen K.E. Water balance of over-wintering beetles in relation to strategies for cold tolerance. *J. Comp.Physiol. B.* 1993; 163: 1-4.

Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramakrishna S. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng.* 2005; Jan-Feb. 11(1-2): 101-109.

McDevitt LM. Etiology and impact of cytomegalovirus disease on solid organ transplant recipients. *Am J Health Syst Pharm.* 2006; 63 (19 S5): 3-9.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78 (2): 7634-7638.

Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K, Hogan BL. Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature.* 1991; 353 (6346): 750-752.

Matsumura KN, Guevara GR, Huston H, Hamilton WL, Rikimaru M, Yamasaki G, Matsumura MS. Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: preliminary clinical report. *Surgery* 1987; 101(1): 99-103.

Meana A, Martinez R, Cañal P, Arriaga MJ, Román FS, Llames S, Orós C, Moreno A, Fernandez C. Cancellous bone homograft storage with aluminium-polyethylene bags. *Cell Tissue Bank.* 2006; 7(3): 203-6.

Meana A, Iglesias J, Del Rio M, *et al.* Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns.* 1998; 24: 621-630.

Naber SP, Smith LL Jr, Wolfe HJ. Role of the frozen tissue bank in molecular pathology. *Diag. Mol. Pathol.* 1992; 1: 73-79.

Nagy ZP, Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Kort HI, Vajta G. The efficacy and safety of human oocyte vitrification. *Semin Reprod Med* 2009; Nov. 27(6): 450-5.

Orwin EJ, Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng.* 2000; 6: 307-319.

Packard Gary C, Packard Mary J. To freeze or not to freeze: adaptations for overwintering by hatchlings of the North American painted turtle. *Journal of Experimental Biology* 2004: 2897-2906.

Pedersen JA, Swartz MA. Mechanobiology in the thurd dimension. *Ann Biomed.*2005; Nov. 33(11): 1469-90.

Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Mthods Mol Biol.* 2007; 368: 39-57.

Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, De Luca M. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol.* 1999; 145(4): 769-782.

Penn MS, Francis GS, Ellis SG, Young JB, McCarthy PM, Topol EJ. Autologous cell transplantation for the treatment of damaged myocardium. *Prog Cardiovasc Dis.* 2002; 45 (1): 21-32.

Porter RA, Brown RA, Eastwood M, Occleston NL, Khaw PT. Ultrastructural changes during contraction of collagen lattices by ocular fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 1998; 6: 157-166.

Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003; 19: 1-22.

Rahimi F., Shepherd C.E., Halliday G.M., Geczy C.L. and Raftery M.J. Antigen-epitope retrieval to facilitate proteomic analysis of formalin-fixed archival brain tissue. *Anal. Chem.* 2006; 78: 7216-7221.

Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature.* 1992; 359(6395): 550-551.

Reichl S. and Muller-Goymann C.C. The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int. J. Pharm.* 2003; 250: 191-201.

Ross, M.H., Pawlina, W. *Histología: texto y atlas color con Biología Celular y Molecular.* Editorial Panamericana 5ª edición 2007.

Rubinsky B., Hong J. and Storey K.B. Freeze tolerance in turtles: visual analysis by microscopy and magnetic resonance imaging. *Am. J. Physiol.* 267, R1078-R1088

Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AM. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes.* 2001; 50 (4): 710-719.

Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2003; Jun. 30; 5: 29-39; discussion 39-40.

Sanchez-Quevedo, M. C., M. Alaminos, *et al*. "Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering." *Histol Histopathol* 2007; 22(6): 631-640

Serrato D, Nieto-Aguilar R, Garzón I, Roda O, Campos A, Alaminos M. Evaluation of the histological architectural patterns of tissues generated by tissue engineering under different protocols of cryopreservation. *Histology and Histopathology*. 2009; 24(12): 1531-1540.

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23): 13726-13731.

Singer AL, Kucirka LM, Namuyinga R, Hanrahan C, Subramanian AK, Segev DL. The high-risk donor: viral infections in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008; 13(4): 400-404.

Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 2006; 441: 1060.

Smith DM, Agura E, Netto G, Collins R, Levy M, Goldstein R, Christensen L, Baker J, Altrabulsi B, Osowski L, McCormack J, Fichtel L, Dawson DB, Domiati-Saad R, Stone M, Klintmalm G. Liver transplant-associated graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2003; 75(1): 118-126.

Stevens MM, Mayer M, Anderson DG, Weibel DB, Whitesides GM, Langer R. Direct patterning of mammalian cells onto porous tissue engineering substrates using agarose stamps. *Biomaterials*. 2005; 26(36): 7636-7641.

Stevens B, Yang Y, Mohandas A, Stucker B, Nguyen KT. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008; May. 85(2): 573-82

Storey K.B., Storey J.M., S.P.J., Churchill T.A. and Brooks R.J. Hatchling turtles survive freezing during winter hibernation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85, 8350-8354.

Storey KB, Storey JM. Frozen and alive. *Sci Am*. 1990; Dec. 263(6): 92-97.

Storey KB. Biochemistry of natural freeze tolerance in animals: molecular adaptations and applications to cryopreservation. *Biochem Cell Biol.* 1990; Apr. 68(4): 687-98.

Storey KB, Storey JM. Natural freezing survival in animal. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1996; 27: 365-386.

Sundelacruz S, Kaplan DL. Stem cell-and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol.* 2009; Aug. 20(6): 646-655.

Tegtmeyer S, Papantoniou I, Muller-Goymann CC. Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm.* 2001; 51: 119-125.

Teraoka S, Sato S, Sekijima M, Iwado K, Urashima Y, Kudo S, Kai K, Koyama I, Tojinbara T, Nakajima I, Fuchinoue S. Comparative study of clinical outcome in kidney transplantation between early steroid withdrawal protocol using basiliximab, calcineurin inhibitor, and mycophenolate mofetil and triple regimen consisting of calcineurin inhibitor, mycophenolate mofetil, and steroid. *Transplant Proc.* 2005; 37(2): 791-794.

Terenghi G, Wiberg M, Kingham PJ. Chapter 21: Use of stem cells for improving nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 87: 393-403.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282(5391): 1145-1147.

Yamada KM, Pankov R, Cukierman E. Dimensions and dynamics in integrin function. *BRAZ j Med Biol Res.* 2003; Aug. 36(8):959-966

Yeh H, Olthoff KM. Live donor adult liver transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2008; 13(3): 241-246.

Zachariassen K.E. The water relations of overwintering insects. *In Insects at Low Temperature* (ed. R.E. Lee, Jr and D. L. Denlinger), 1991; 47-63.