

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS
CONDROCITOS DE LA ARTICULACIÓN
TEMPOROMANDIBULAR PARA SU
UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR
MAXILOFACIAL**

TESIS DOCTORAL

Ana Belén Marín Fernández

Departamento de Histología

Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial

2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ana Belén Marín Fernández
D.L.: GR 44-2013
ISBN: 978-84-9028-259-5

**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS CONDROCITOS DE LA
ARTICULACIÓN TEMPOROMANDIBULAR PARA SU UTILIZACIÓN EN
INGENIERÍA TISULAR**

Memoria que presenta la Licenciada en Medicina y Cirugía
Ana Belén Marín Fernández
para optar al grado de Doctor en Medicina

Fdo.: Ana Belén Marín Fernández

VºBº El Director de la Tesis
Dra. Dª. Ingrid J. Garzón Bello

VºBº El Director de la Tesis
Dr. D. Miguel Alaminos Mingorance

VºBº El Director de la Tesis
Dr. D. Víctor Sebastián Carriel Araya

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA

SERVICIO DE CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL
HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES

UNIVERSIDAD DE GRANADA

2012



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Histología

Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular CTS - 115

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por el Proyecto de Investigación FIS PI11/02668 financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III.

A toda mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Mis primeras palabras de agradecimiento van dirigidas a mis padres y a mi marido Carlos, ya que sin su cariño, apoyo y sabios consejos, habría sido difícil alcanzar lo que hoy soy.

También quiero expresar mi gratitud a todo el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada por la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación y por desarrollar, gracias a su gran ayuda, la siguiente Tesis Doctoral. Gracias al Dr. D. Miguel Alaminos, por la atención y tiempo dedicado, y a los Dres. D^a. Ingrid Garzón y D. Sebastián Carriel, por todas sus enseñanzas.

Al Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial, donde he iniciado mi carrera profesional y, en especial, a mi amigo el Dr. D. Darío Sánchez, por el tiempo dedicado y la ilusión que transmite por estos proyectos.

TESIS DOCTORAL

Ana Belén Marín Fernández

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Articulación Temporomandibular.....	5
1.1. Estructura anatómica de la articulación temporomandibular del adulto humano	5
1.2. Estructura histológica de la articulación temporomandibular del adulto humano. Disco articular	12
1.3. Histofisiología articular	22
1.4. Biomecánica articular	24
1.5. Fisiopatología articular	30
1.5.1. Síndrome de Disfunción Temporomandibular	30
1.5.1.1. Epidemiología	31
1.5.1.2. Etiopatogenia	31
1.5.1.3. Clínica	32
1.5.1.4. Fisiopatología discal	32
1.5.1.5. Diagnóstico	35
1.5.1.6. Estadiaje	35
1.5.1.7. Terapéutica	36
1.6. Procedimientos reconstructivos de la articulación temporomandibular. Controversias actuales.....	40
1.6.1. Conceptos generales	40
1.6.2. Discopexia	40
1.6.3. Discectomía	41
1.6.4. Condilotomía. Sustitución articular	42
1.6.5. Controversias en el empleo de materiales autólogos	43
2. Ingeniería Tisular	47
2.1. Conceptos generales	47
2.2. Ingeniería Tisular de la Articulación Temporomandibular	49
2.3. Viabilidad celular	55
2.3.1. Evaluación de la integridad de la membrana celular	57
2.3.2. Ensayos funcionales	58
2.3.3. Ensayos con pruebas de fluorescencia	59
2.3.4. Ensayos morfológicos	59
2.3.5. Microscopía electrónica analítica	59
2.3.6. Determinación del perfil de expresión génica mediante <i>microarray</i>	63
OBJETIVOS	64
MATERIALES Y MÉTODOS	66
1. Aislamiento de condrocitos	67
2. Obtención de subcultivos celulares	68
3. Determinación de la viabilidad celular mediante técnicas mixtas metabólicas y de exclusión de colorantes vitales (Live/Dead®)	69
4. Determinación de la viabilidad celular mediante técnicas de exclusión	69

de colorantes vitales (azul tripán)	
5. Determinación de la viabilidad celular mediante el análisis del perfil iónico cuantitativo mediante microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X	72
6. Determinación de la viabilidad celular mediante el análisis del perfil de expresión génica global utilizando <i>microarray</i> de ARN	78
7. Determinación de la Viabilidad Media	79
8. Análisis estadístico	79
RESULTADOS	81
1. Generación de cultivos primarios de condrocitos de disco articular de la articulación temporomandibular del adulto humano	82
2. Viabilidad celular determinada mediante técnicas mixtas metabólicas y de exclusión de colorantes vitales (Live/Dead®)	83
3. Viabilidad celular determinada mediante técnicas de exclusión de colorantes vitales (azul tripán)	88
4. Viabilidad celular determinada mediante el análisis del perfil iónico cuantitativo mediante microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X	91
5. Viabilidad Media	111
6. Viabilidad celular determinada mediante el análisis del perfil de expresión génica global utilizando <i>microarray</i> de ARN	113
DISCUSIÓN	123
CONCLUSIONES	138
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

La articulación temporomandibular (ATM) o complejo articular temporomandibular es una articulación gínglimoartrodial que articula bilateralmente la mandíbula con el cráneo. Forma parte del Sistema Masticatorio, unidad funcional y estructural encargada de la masticación, el habla y la deglución, aunque también desempeña un papel significativo en la respiración y en la percepción gustativa. Este sistema está a su vez constituido por la articulación alveolodentaria, los ligamentos, los músculos masticadores y un importante mecanismo de control neurológico. Ambas articulaciones, sinovial y dentaria, han de actuar con precisión y armonía; la primera tiene como principal función guiar los movimientos mandibulares y la segunda, al poseer receptores propioceptores (a nivel periodontal), protege todo el sistema de posibles traumas oclusales.

Dentro de la ATM, el hueso temporal se relaciona con los huesos del cráneo y con la mandíbula a través de dos dispositivos articulares. Por una parte, se relaciona con los huesos del cráneo mediante una articulación estática (sinartrosis) y, por otra parte, con el cóndilo mandibular, constituyendo anatómicamente una enartrosis que funcionalmente actúa a modo de bisagra en los movimientos de apertura y cierre mandibular, comportándose como una diartrosis. Desde el punto de vista funcional, se clasifica como una diartrosis bicondílea, ya que articula dos huesos cuyas superficies convexas se encuentran articuladas a una cavidad y que contiene un disco ó menisco articular que adapta ambas estructuras óseas, siendo todo ello lubricado por el líquido sinovial. A su vez, cada ATM está constituida por dos estructuras, una superior ó temporodiscal y una inferior ó discocondilar.

La ATM es una articulación de características funcionales exclusivas, ya que los movimientos de una no son independientes de la otra, sino que al realizar un movimiento los músculos del lado derecho e izquierdo deben actuar simultáneamente de forma sinérgica y antagonista. Este movimiento recíproco es único en el organismo (Gómez de Ferraris y Campos; 2009).

La ATM se encuentra íntimamente relacionada con la oclusión dentaria y el sistema neuromuscular, ya que sus movimientos no están guiados únicamente por la forma anatómica del hueso y del sistema músculo-ligamentoso, sino también por la oclusión dental. Por su compleja dinámica articular, cualquier trastorno funcional o patológico que asiente en alguno de sus componentes afectará el normal funcionamiento de todo el sistema (Gómez de Ferraris y Campos; 2009).

Para comprender esta compleja unidad articular y la patología que asienta en ella, hay que tener sólidos conocimientos sobre la anatomía, la histología, la fisiología y la biomecánica articular, aspectos que proporcionan las bases biológicas para el logro de un buen diagnóstico, una adecuada terapéutica y una acertada prevención de las disfunciones articulares.

Dentro de las patologías que afectan a la ATM podemos destacar el Síndrome de Disfunción Temporomandibular (SDTM), también denominado como “Síndrome de desarreglos internos”, por la incidencia elevada que existe en la población. Dicha alteración fue definida por Dolwick en 1983 como:

“Una relación anormal del disco articular respecto al cóndilo, fosa y eminencia de la articulación temporomandibular”.

Se trata de una patología multifactorial caracterizada por una anormal relación del disco articular respecto al cóndilo, fosa y eminencia de la articulación temporomandibular. Junto a otras alteraciones estructurales y funcionales que se producen en la articulación tenemos la degeneración progresiva del disco articular, generalmente por un desplazamiento anterior del mismo, alterando la cinética articular y provocando la aparición de una serie de síntomas (dolor, chasquidos, bloqueos, limitación en la apertura oral, etc.), que caracterizan a dicha enfermedad. En los primeros estadios de la enfermedad el abordaje es multidisciplinar, mientras que en estadios avanzados de la patología donde se asocia una degeneración progresiva del disco, nos encontramos con la necesidad de realizar una extirpación quirúrgica del mismo, quedando una alteración estructural y funcional articular importante que puede desembocar en la aparición de grandes secuelas.

Los nuevos estudios de investigación buscan entender la biología, composición, metabolismo, organización ultraestructural y molecular, y las propiedades biomecánicas del disco articular con la esperanza de desarrollar un procedimiento de reparación biológica como una alternativa a los tratamientos existentes para el SDTM, con el objetivo de hallar un sustituto biológico viable con las propiedades bioquímicas y biomecánicas del disco articular normal y así poder restituir el normal funcionamiento articular.

En la presente Tesis Doctoral se desarrolla un estudio de viabilidad de los condrocitos del disco articular de la ATM de pacientes que presentan un SDTM en un estadio avanzado, para su utilización en Ingeniería Tisular de dicho disco articular. Para ello,

consideraremos en la introducción, como fundamento de la investigación a realizar, los siguientes apartados:

- Articulación Temporomandibular, donde se desarrollará la anatomía, histología, histofisiología, biomecánica y fisiopatología articular.
- Ingeniería Tisular, que se centrará en la Ingeniería Tisular de la ATM y en la Viabilidad Celular.

A continuación enunciaremos los objetivos del trabajo de investigación y describiremos los materiales y métodos utilizados. Por último, se describirán los resultados obtenidos, la discusión y las conclusiones derivadas de este estudio.

1. ARTICULACIÓN TEMPOROMANDIBULAR

1.1. ESTRUCTURA ANATÓMICA DE LA ARTICULACIÓN TEMPOROMANDIBULAR DEL ADULTO HUMANO

La ATM es, anatómicamente, una enartrosis y, funcionalmente, una diartrosis móvil que articula mandíbula y cráneo, la cual está formada por el cóndilo y fosa mandibular y por la eminencia articular del hueso temporal (Figura 1).

A continuación, vamos a desarrollar la estructura anatómica de los principales componentes de la ATM.

- Cóndilo mandibular

El cóndilo mandibular es una estructura ovoidea con el eje mayor dirigido hacia atrás y adentro, que se une a través del cuello con la mandíbula. En su parte anterointerna se articula el músculo pterigoideo lateral. En la base del cráneo se articula con la porción escamosa del hueso temporal, en la fosa glenoidea. Está recubierto por tejido conjuntivo diferenciado en tres capas, que de fuera hacia dentro son: tejido fibroso superficial, tejido fibroelástico y una capa profunda fibrocartilaginosa. Entre esta última capa y el hueso se encuentra otra capa de cartilago mineralizado que actuaría en los procesos de remodelación condilar.

- Fosa glenoidea o mandibular

La fosa glenoidea constituye la porción cóncava de la base del cráneo a nivel de la escama del hueso temporal. Se encuentra limitada posteriormente por la cisura de Gasser y anteriormente por una gruesa eminencia denominada *eminencia articular*. El grado de convexidad de dicha estructura determina el mayor o menor recorrido del cóndilo en los movimientos de apertura oral.

- Disco articular

El disco articular constituye la estructura más importante de la articulación. Es una estructura fibrocartilaginosa densa bicóncava localizada entre ambas superficies articulares, cuya función es acomodar las acciones de tipo bisagra y de deslizamiento entre ellas. La superficie superior del disco se adapta a los contornos de la fosa y la eminencia del hueso temporal, y la superficie inferior se adapta al contorno del cóndilo mandibular, contribuyendo así a la distribución de las cargas ejercidas sobre las áreas de contacto, a la absorción de la presión y a la

lubricación articular (Figuras 2 y 3). Una de las principales funciones es controlar la presión que el cóndilo ejerce sobre el hueso temporal (Jagger; 1994).

El disco divide la articulación en un compartimento superior, en el que tienen lugar los movimientos de traslación, y otro inferior, más pequeño, en el que ocurren los movimientos de rotación.

Según Rees (Rees; 1954), el disco está dividido en 3 zonas en sentido antero-posterior: banda anterior, zona intermedia y banda posterior. La zona intermedia central es de manera considerable más delgada (1mm) que las bandas posterior (3mm) y anterior (2mm). El significado de esta variación en el grosor es que la zona intermedia, al ser más delgada, permite al disco ser más flexible y facilitar la conversión entre cóncavo y convexo, lo que permite a su vez que el cóndilo se mueva en un arco circular (Rees; 1954). No posee vasos sanguíneos ni terminaciones nerviosas, excepto en su extremo periférico donde está ricamente vascularizado e innervado. El disco posee una serie de uniones con las estructuras contiguas (Rees; 1954): medial y lateralmente se une con la cápsula, sujetando el polo medial y lateral del cóndilo y permitiendo la rotación condilar en relación con el disco; anteriormente el disco se une, por arriba, a la región anterior de la eminencia temporal (mediante fibras elásticas) y, por abajo, a la zona anterior del cóndilo (unión compuesta por fibras no elásticas); posteriormente se continúa o se une a la zona bilaminar vascularizada (o tejido retrodiscal), la cual se une al hueso temporal y a la cara posterior del cuello condilar. El plexo venoso de la cara posterior se rellena cada vez que el disco experimenta movimientos de desplazamiento anterior. Los tejidos de inserción posterior se adhieren a la placa timpánica del hueso temporal en la parte posterosuperior y al cuello del cóndilo en la parte posteroinferior. En la parte anterior el disco, la cápsula y la fascia de la cabeza superior del músculo pterigoideo lateral son contiguos.

El disco y sus uniones dividen el espacio articular en una región superior y otra inferior, siendo sus volúmenes 1 y 0,5 ml, respectivamente (Dolwick; 1983), (Ogus; 1986).

En una visión anterior, desde el punto de vista anatómico, el disco es más grueso medialmente, correspondiéndose con un aumento del espacio articular a nivel medial de la articulación.

En una visión lateral, en condiciones normales, el cóndilo se posiciona sobre la región más delgada del disco, la porción intermedia, siendo el borde posterior más grueso que el anterior.

De este modo, durante los movimientos articulares el disco se puede adaptar a las distintas superficies articulares, alterándose en caso de fuerzas destructivas ó alteraciones biomecánicas severas.

En el hueso temporal, la zona anterior de la fosa mandibular corresponde a la vertiente posterior de la eminencia articular. Lateromedialmente, la fosa mandibular y el cóndilo miden aproximadamente 23 y 20 mm., respectivamente (Dolwick; 1983). Ambos son más estrechos en sentido antero-posterior, midiendo aproximadamente 19 y 10 mm., respectivamente (Dolwick; 1983). Al igual que el cóndilo y la fosa, el disco es más ancho en sentido lateromedial que antero-posterior, aproximadamente 19 x 13 mm.

- *Cápsula articular*

La cápsula fibrosa es una fina capa de tejido que rodea completamente la articulación. Define los límites funcionales y anatómicos de la ATM, rodeando la superficie articular del cóndilo y fusionándose con el periostio del cuello mandibular. A nivel del hueso temporal rodea las superficies articulares de la eminencia y de la fosa glenoidea.

En su porción lateral se trata de una estructura bien definida que funcionalmente limita la traslación anterior del cóndilo. En dicha región está reforzada por el ligamento temporomandibular. Dicho ligamento se inserta en la superficie externa de la raíz del arco cigomático y convergiendo dorsocaudalmente se inserta en la porción posterior del cóndilo.

Firmemente adherida al hueso, por delante, se inserta frente a la cresta de la prominencia articular; a los lados, se adhiere al borde de la eminencia y de la fosa; y por detrás, se extiende en sentido medial a lo largo del borde anterior de las hendiduras petrotimpánica y escamotimpánica. Medialmente se une a la sutura esfenoescamosa.

Existe una zona de debilidad en la porción anterior que corresponde al orificio existente para el paso del tendón del pterigoideo lateral, a través de la cual se puede producir una herniación de los tejidos intraarticulares y, por lo tanto, un

desplazamiento del disco. Su porción medial se relaciona anatómicamente con varias estructuras en la vecindad de la fisura petrotimpánica: arteria meníngea media, ligamento esfenomandibular y el nervio auriculotemporal. La membrana sinovial que tapiza la cápsula cubre todas las superficies intraarticulares excepto las zonas de presión del fibrocartílago. Entre sus funciones, además de envolver la articulación, retiene el líquido sinovial y opone resistencia a cualquier fuerza medial, lateral o vertical inferior que tienda a separar o luxar las superficies articulares.

El líquido articular está producido por las células que tapizan las superficies articulares situadas anteriormente al tejido retrodiscal y ambas cavidades articulares. Tiene una doble función: por un lado sirve como nutriente para las superficies articulares que son avasculares y, por el otro, lubrica estas superficies durante la función, tanto en el movimiento como en la carga (Alomar; 2007).

- Sistema ligamentoso articular

Los ligamentos son estructuras que unen los huesos articulares y que están constituidas por densos haces de fibras colágenas que se disponen direccionadas en paralelo para soportar mejor las cargas. La ATM tiene ligamentos principales o directos, que intervienen en la función de la misma articulación, y ligamentos de acción indirecta o accesorios, que por sus inserciones restringen en parte la proyección anterior de la mandíbula, limitando los movimientos condilares.

Los ligamentos principales son: 1. Ligamento Capsular, que rodea y envuelve la articulación; 2. Ligamentos Colaterales, que permiten al disco moverse pasivamente con el cóndilo (anatómicamente se distinguen un ligamento colateral medial y lateral); 3. Ligamento Temporomandibular, en el que se aísla una porción oblicua que limita el movimiento rotacional normal de apertura y una porción horizontal que limita el desplazamiento posterior de la unidad disco-cóndilo; 4. Ligamento Temporodiscal.

Entre los accesorios hay que mencionar: 1. Ligamento Pterigomandibular; 2. Ligamento Esfenomandibular; 3. Ligamento Estilomandibular, que limita los movimientos extremos de protrusión mandibular.

- Musculatura, vascularización e inervación articular

Los músculos de la articulación se organizan en dos sistemas: los músculos

elevadores que cierran la mandíbula (masetero, temporal y pterigoideo medial) y los que la descenden durante la apertura (pterigoideo lateral, digástrico y milohioideo).

El músculo pterigoideo lateral es el más importante en lo que respecta a la relación con el disco articular y la ATM. Está formado por dos porciones: una cabeza superior que se origina en la superficie infratemporal del esfenoides, y una cabeza inferior originada en la superficie lateral del ala lateral de la apófisis pterigoides. Ambas se insertan en la zona subcondílea y en el disco articular. La cabeza inferior interviene en la apertura oral, la protrusión y la lateralización contralateral, de tal forma que su contracción unilateral induce un movimiento mediotrusivo y su contracción bilateral protruye la mandíbula a través de la impactación condilar. En cambio, la cabeza superior lo hace en los movimientos de retrusión, lateralización ipsilateral y cierre de la mandíbula. Su acción es especialmente activa durante la mordida potente, siendo responsable del fenómeno del bruxismo (Murray; 2007).

La ATM está bien vascularizada, pues posee un rico plexo vascular procedente de las arterias temporal superficial, meníngea media, timpánica anterior y faríngea ascendente (ramas terminales de la carótida externa), que llegan hasta la cápsula articular. Estas arterias se distribuyen en la periferia del disco, siendo la zona central avascular. Se han encontrado pequeños capilares en las vellosidades sinoviales subyacentes a la membrana sinovial. Dicha localización tiene importancia para la producción del líquido sinovial.

La vascularización de la ATM está compuesta principalmente por: arteria temporal superficial, para la porción posterior; arteria meníngea media, para la porción anterior; y arteria maxilar interna, para la porción inferior.

La ATM está innervada por ramificaciones del nervio auriculotemporal que, abandonando la rama mandibular, asciende laterosuperiormente abrazando la cara posterior articular, el masetero y temporal profundo, y ramas del nervio trigémino, que pueden penetrar en la cápsula, disco y vellosidades sinoviales. En la cápsula, las terminaciones nerviosas pueden ser del tipo de fibras nerviosas, terminaciones nerviosas libres y encapsuladas (corpúsculos de Ruffini, Pacini y Meissner). En el disco se observan solo terminaciones nerviosas libres (nociceptores) en la región periférica, mientras que la zona central carece de fibras y, por lo tanto, de sensibilidad dolorosa.

En las vellosidades se han encontrado, también, terminaciones nerviosas de aspecto corpuscular (mecanoreceptores).



Figura 1. Imagen macroscópica de la articulación temporomandibular donde se pueden apreciar las distintas estructuras óseas: cóndilo mandibular, eminencia temporal y cavidad glenoidea.



Figura 2. Articulación temporomandibular donde se puede apreciar la disposición del disco articular en la cavidad glenoidea adaptado a ambas superficies articulares (cóndilo mandibular y eminencia temporal).

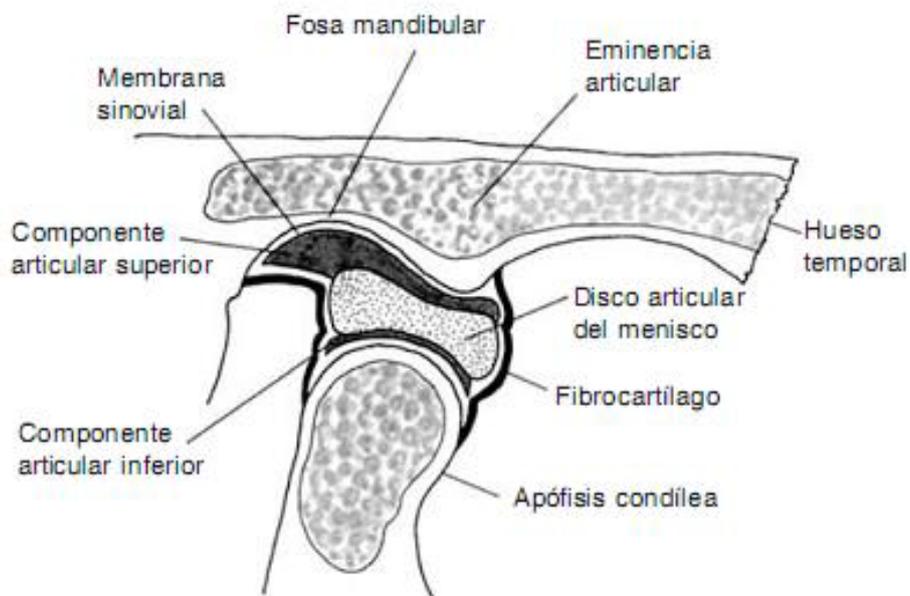


Figura 3. Representación esquemática de la articulación temporomandibular.

1.2. ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LA ARTICULACIÓN TEMPOROMANDIBULAR DEL ADULTO HUMANO

Tanto las superficies articulares de la ATM como el disco articular, tema de investigación de la presente tesis doctoral, están compuestos por tejido cartilaginoso. El tejido cartilaginoso es un tipo de tejido conjuntivo especializado, constituido por células y matriz extracelular.

Las células, denominadas condrocitos, están rodeadas por abundante matriz extracelular. Los condrocitos sintetizan y segregan los componentes orgánicos de la matriz extracelular, que son, básicamente, colágeno, proteoglicanos y glucosaminoglicanos. Según las características de la matriz se distingue tres tipos de tejido cartilaginoso (Finn; 2002): el hialino (Figura 4), que es el más abundante en el cuerpo humano, el elástico y el fibroso (Figura 5 y 6). El cartílago es avascular y aneuronal, y los condrocitos se nutren con material que difunde desde los capilares sanguíneos del tejido adyacente ó del líquido articular. En lo que respecta a la regeneración, crecimiento y proliferación activa del cartílago, ésta se limita a los primeros años de vida.

El cartílago hialino está formado principalmente por fibras de colágeno tipo II y posee condrocitos dispuestos en grupos. Este tipo de cartílago posee pericondrio y es de aspecto blanquecino azulado. Se encuentra en el esqueleto nasal, la laringe, la tráquea, los bronquios, los arcos costales y en las superficies articulares de los huesos.

El cartílago elástico está formado también por fibras de colágeno tipo II y por fibras elásticas. Presenta pericondrio, es amarillento y tiene mayor elasticidad y flexibilidad que el hialino. Se encuentra en la epiglotis y en el aparato auditivo.

El cartílago fibroso o fibrocartílago es una transición entre el tejido conectivo denso y el cartílago hialino, con fibras de colágeno tipo I. Carece de pericondrio. Se encuentra en los discos intervertebrales, discos articulares y meniscos y en la inserción de los ligamentos y tendones.

La ATM y el disco articular están formados, desde el punto de vista histológico, por cartílago fibroso o fibrocartílago. A diferencia de otros tejidos cartilaginoso, los estudios de investigación del disco articular de la ATM del humano se encuentran en sus primeros estadios en lo que respecta a estudios de caracterización. Algunos estudios, como el de Almarza y Athanasiou (Almarza y Athanasiou; 2004), demuestran que,

aparte de ser un tejido que presenta características muy distintas al cartílago articular (cartílago hialino), también presenta diferencias con los tejidos fibrosos o fibrocartílagos, como el del menisco de la rodilla. Todo esto nos resalta la necesidad de seguir desarrollando estudios de caracterización a cerca de la composición y función del disco articular como paso previo al desarrollo mediante Ingeniería Tisular de un implante viable.

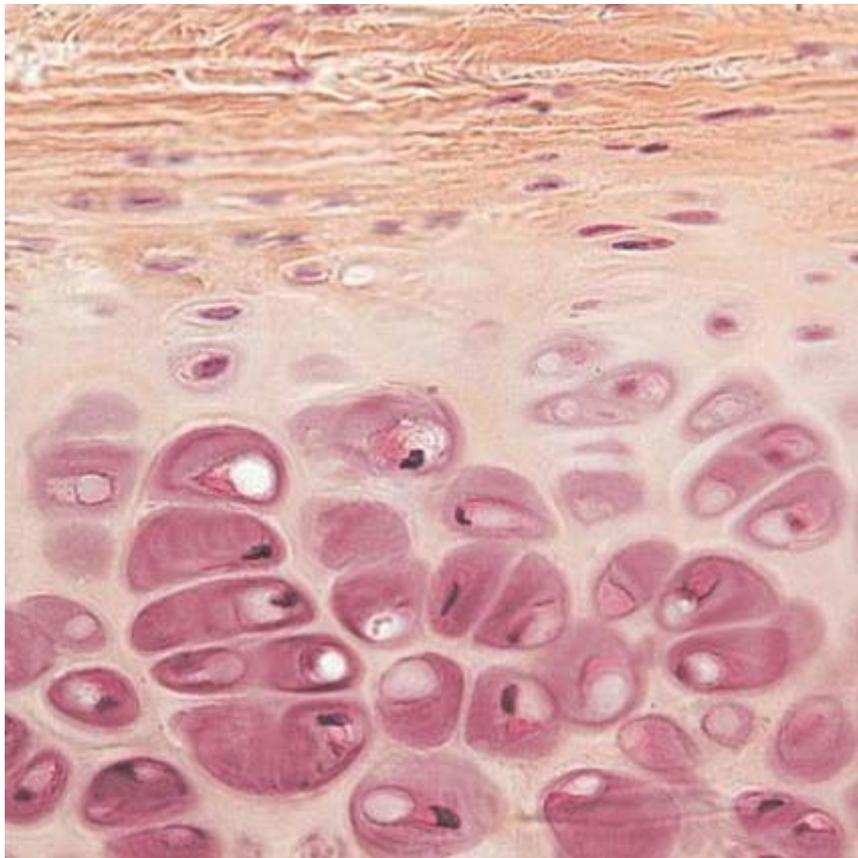


Figura 4. Imagen de microscopía óptica de cartílago hialino (Rosales R; 2008).

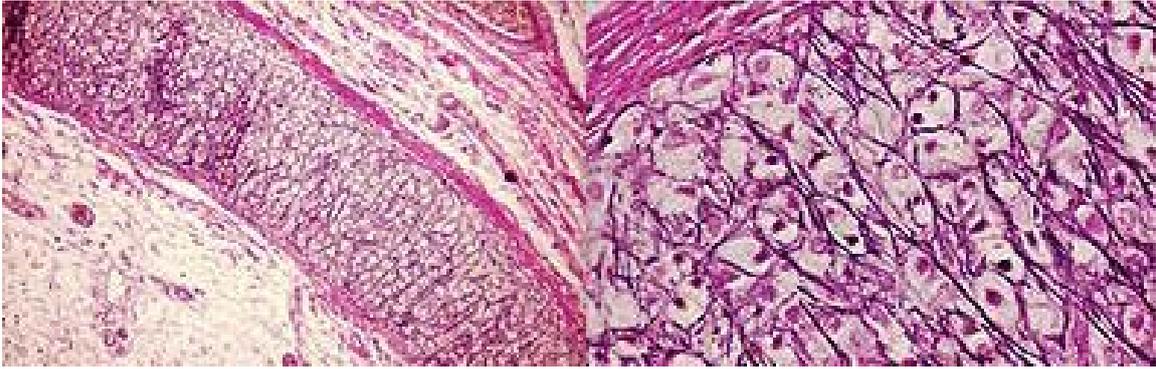


Figura 5. Imágenes de microscopía óptica de cartílago elástico.

<http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/segundo/histologia/HistologiaWeb/paginas/co25505.html>

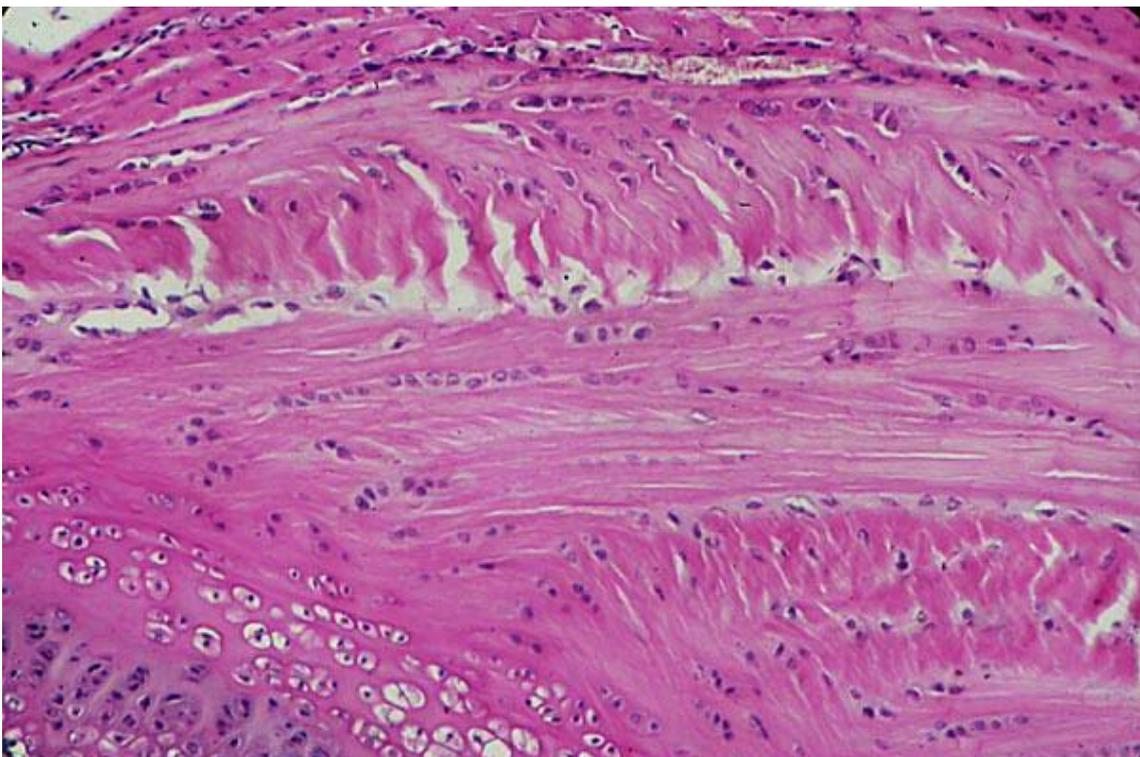


Figura 6. Imagen de microscopía óptica de cartílago fibroso.

<http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/segundo/histologia/HistologiaWeb/paginas/co25505.html>

A continuación, vamos a describir las características estructurales, desde el punto de vista histológico, de los componentes más importantes de la ATM del humano adulto: superficies articulares, membranas sinoviales y líquido sinovial y disco articular.

- Superficies articulares

Las *áreas o superficies articulares* destinadas a soportar o resistir las fuerzas mecánicas que se originan durante los movimientos mandibulares, se denominan *áreas funcionales*. Estas superficies funcionales están recubiertas por un tejido conectivo fibroso de mayor espesor, localizado por un lado en la vertiente posterior de la eminencia temporal, donde alcanza un grosor de 0,50 mm y a nivel de la carilla articular del cóndilo mandibular, donde presenta un espesor de 2 mm. Su función consiste en amortiguar las presiones y distribuirlas sobre las superficies óseas articulares. Las fibras de colágeno (tipo I) superficiales se distribuyen de forma paralela a las superficies libres, mientras que las fibras profundas lo hacen en sentido perpendicular.

Desde el punto de vista histológico las superficies articulares están revestidas, como se ha indicado anteriormente, por una zona de tejido conectivo fibroso, por debajo del cual existe una zona proliferativa muy delgada. Esta capa en la ATM adulto es la que suministra los fibroblastos para renovar el tejido fibroso articular. Subyacente a esta zona proliferativa se observan sucesivamente una zona de fibrocartílago y otra zona muy delgada de cartílago calcificado, tras la cual se encuentra el tejido óseo subarticular, tanto a nivel mandibular, como temporal (Gómez de Ferraris y Campos; 2009). Durante el desarrollo pre y postnatal, el área proliferativa de células indiferenciadas da también origen a los condrocitos subyacentes.

- Membrana sinovial y líquido sinovial

Desde el punto de vista histológico, la cápsula articular posee dos capas, una externa fibrosa y una interna muy delgada o *membrana sinovial*, la cual tapiza el interior de dicha cápsula. Esta membrana produce el líquido sinovial que se almacena en los fondos de saco de las cavidades supra e infradiscal. Las membranas sinoviales representan los medios de deslizamiento de la articulación y están formadas por dos capas: la sinovial interna, que limita con los espacios de la articulación, y la subsinovial, unida al tejido conectivo fibrosos de la cápsula.

Estas membranas revisten por completo la cápsula articular de la ATM del adulto,

tanto la cavidad superior como inferior, pero, sin embargo, están ausentes en el tercio medio del disco en la articulación adulta.

La membrana sinovial contiene una población heterogénea de células. Entre ellas destacan células con actividad fagocítica y células con capacidad de secreción del ácido hialurónico. Las células sinoviales aparecen dispuestas en una capa continua, aunque a menudo se hallan entremezcladas con fibras del conectivo capsular y con células adiposas (Gómez de Ferraris y Campos; 2009). Dado que las células sinoviales no limitan con una lámina basal, se considera que no constituyen una verdadera membrana. En ocasiones, forman vellosidades que se pueden proyectar hacia la cavidad articular. Algunas vellosidades son avasculares y otras contienen tejido conectivo y células adiposas. En general, las vellosidades son escasas y aumentan en número en las patologías articulares.

Con microscopía electrónica de transmisión se han identificado dos tipos de células sinoviales, tipo A y tipo B. Las células tipo A poseen un complejo de Golgi muy desarrollado y numerosas vesículas lisosomales, característica de las células con actividad fagocítica. Las tipo B poseen un complejo de Golgi más pequeño, retículo endoplásmico rugoso (RER) muy desarrollado y abundantes gránulos productores de una secreción rica en glicoproteínas y glucosaminoglucanos, entre los que se destacan el ácido hialurónico y la lubricina (Gómez de Ferraris y Campos; 2009).

Existen controversias sobre el origen y la función específica de las células A y B de la sinovial. Las células tipo A, menos abundantes (20%), se originarían de los monocitos derivados de la médula ósea, en tanto que las células B (70%) se diferenciarían de las células mesenquimales de los blastemas articulares. Recientemente se ha identificado la presencia de células dendríticas en el corion subsinovial, de función similar a las células de Merckel receptoras de sensaciones mecánicas (mecanorreceptores) (Dijkgraaf; 1996).

La matriz extracelular (MEC) de la membrana sinovial contiene fibrillas de colágeno inmersas en un material amorfo electrodenso. Las células sinoviales están ausentes en las zonas articulares funcionales (Gómez de Ferraris y Campos; 2009).

En la subsinovial se pueden encontrar diversas variedades de tejido conectivo; de acuerdo a ello, dicha capa se clasifica en: tipo areolar o laxa, tipo fibrosa y tipo adiposa (variedad ausente en condiciones normales). La presencia de un tipo

u otro depende de las demandas a las resistencias mecánicas de la región, de la edad o de la patología. Dicha estructura está irrigada por una red de capilares que pueden ser de tres tipos, continuos, fenestrados y discontinuos. También se han observado vasos linfáticos que se originan en fondo de saco a corta distancia de la superficie sinovial.

El *líquido sinovial*, cuya función es lubricar y nutrir la articulación, es producido como un ultrafiltrado del plasma sanguíneo a partir de la rica red vascular de la membrana sinovial. Posee una coloración amarillenta clara y contiene abundante ácido hialurónico y mucinas, que le otorgan la viscosidad característica. También presenta células libres descamadas y macrófagos.

Normalmente, se deposita en los bordes y en el fondo de saco de la región posterior. Durante los movimientos articulares, sin embargo, el líquido se desplaza de un sitio a otro (mecanismo conocido como «lubricación límite»). En reposo, los sinoviocitos B elaboran pequeñas gotitas de líquido sinovial para favorecer aún más la lubricación articular (mecanismo llamado «de lágrima»). Desde el punto de vista funcional, el líquido sinovial tiene por finalidad, además de lubricar las distintas regiones articulares, nutrir los condrocitos y, por la capacidad fagocítica de los sinoviocitos A, degradar y eliminar las sustancias de desecho.

- Disco articular

El *disco articular*, tal y como se mencionó previamente, está formado por tejido cartilaginoso fibroso o fibrocartílago. Como todo tejido cartilaginoso, está compuesto por agua (un 70% del disco es agua), células y matriz extracelular.

- Células

Las células del disco articular son denominadas comúnmente como fibrocondrocitos (Landesberg *et al.*; 1996), (Berkovitz y Pacy; 2000). De este modo, podemos identificar en el disco articular células tipo condrocito y células tipo fibroblasto (Landesberg *et al.*; 1996), (Detamore *et al.*; 2006).

Los resultados obtenidos a partir de distintos estudios de investigación sugieren la existencia de un predominio del fenotipo fibroblástico. Se ha observado que el disco articular del cerdo está formado por un 70% de fibroblastos y un 30% aproximadamente de condrocitos (Detamore *et al.*; 2006). Los discos del cerdo adulto poseen mayor celularidad en la periferia, a diferencia de lo observado en los

discos humanos fetales donde la mayor celularidad se encuentra en la porción central (Detamore *et al.*; 2006). La distribución de los distintos tipos celulares dentro del disco articular también presentan diferencias. Así, la población celular que predomina en la región central son los condrocitos, y las células de la periferia tienden a ser más fibroblastos (Milam *et al.*; 1991), (Mills *et al.*; 1994), (Detamore *et al.*; 2006).

Los resultados obtenidos tras revisar la literatura existente indican que la información acerca de las poblaciones celulares es muy variable. Estas variaciones pueden ser debidas a los modelos animales desarrollados, a la edad, la dieta y la patología. El único resultado aceptado en los distintos estudios de investigación es que el disco articular de la ATM posee tanto fibroblastos como condrocitos. Todo esto revela la necesidad de continuar desarrollando estudios de caracterización de las poblaciones celulares para su posterior utilidad dentro de la Ingeniería Tisular del disco articular.

- Colágeno y elastina

Partiendo de los distintos estudios de caracterización del disco articular, se ha observado que el colágeno tipo I es el componente más predominante en el disco articular, constituyendo entre el 80-90% aproximadamente del peso seco (Nakano y Scott; 1989) y el 50% del volumen del disco articular (Almarza y Athanasiou; 2004). Estas fibras se ordenan de forma paralela tanto a las fibras de la zona intermedia como a las fibras de las bandas anterior y posterior. También se ha observado, aunque en una proporción muy inferior, fibras de colágeno tipo III, VI, IX y XII.

La elastina se ha demostrado que está presente en todas las regiones del disco articular y en sus uniones posteriores (O'Dell *et al.*; 1990), (Minarelli y Liberti; 1997), (Mills *et al.*; 1994), (Detamore *et al.*; 2005), aunque en una proporción mucho menor que las fibras de colágeno. Minarelli y Liberti (Minarelli y Liberti; 1997) encontraron que las fibras de elastina se posicionaban de forma paralela a las fibras de colágeno en la zona intermedia y en la banda anterior y posterior del disco humano. Gross *et al.* (Gross *et al.*; 1999) observaron que había mayor densidad de fibras de elastina en la superficie superior del disco con respecto a la inferior; a su vez, observaron que las fibras de elastina eran más numerosas en la periferia que en la zona central. Detamore *et al.* (Detamore *et al.*; 2005) publicaron que las fibras de elastina eran más abundantes en la zona posterior y, un estudio dirigido por O'Dell (O'Dell *et al.*; 1990) detectó una densidad mayor de elastina en

el tejido de unión de la banda posterior.

- Glucosaminoglucanos

El contenido total de glucosaminoglucanos (GAG) en el disco articular de la ATM varía entre el 1-10% del peso seco (Axelsson *et al.*; 1992); sin embargo, la mayoría de los estudios de investigación realizados indican un contenido total de aproximadamente un 5% (Nakano y Scott; 1989), (Axelsson *et al.*; 1992), (Detamore *et al.*; 2005). Como en el cartílago articular, el condroitín-sulfato (CS) y el dermatán sulfato (DS) son los GAG más abundantes en el disco articular, alcanzando el CS aproximadamente un 70-80% del total de los GAG (Nakano y Scott; 1989), (Detamore *et al.*; 2005) y el DS el 15-25% del total (Nakano y Scott; 1989). El ácido hialurónico, el keratán sulfato y el heparán sulfato también pertenecen a los GAG del disco articular, aunque su contenido es mucho menor (Nakano y Scott; 1989), (Axelsson *et al.*; 1992), (Detamore *et al.*; 2005).

No existe consenso en la literatura publicada a cerca de la distribución de los GAG y proteoglucanos en el disco articular de la ATM. Almarza *et al.* (Almarza *et al.*; 2005) observaron que el contenido total de GAG era mayor en la región medial en comparación con la región lateral y central, y que en la región posterior era donde menor contenido de GAG se encuentra. En los estudios de investigación desarrollados por Detamore *et al.* (Detamore *et al.*; 2005) se obtuvieron resultados similares a los obtenidos por Almarza. Por el contrario, los estudios realizados por Nakano y Scott (Nakano y Scott; 1996) observaron mayor porcentaje de GAG en la región medial que en la periferia. Mills *et al.* (Mills *et al.*; 1994) obtuvo resultados opuestos a Nakano y Scott, ya que observó mayor cantidad de GAG en las regiones anterior y posterior en comparación con la zona central. El único resultado obtenido en común por todos estos estudios es que la cantidad de GAG del disco articular de la ATM es mucho menor que en el cartílago articular (cartílago hialino).

- Proteoglucanos

La distribución de los proteoglucanos (Figura 7) en el disco articular es igual de compleja que la distribución de los GAG, ya que no existe consenso entre los distintos estudios de investigación desarrollados.

El proteoglucano agregan, proteoglucanos de condroitín sulfato, es uno de los proteoglucanos que se encuentran en el disco articular de la ATM. Mizoguchi *et al.* (Mizoguchi *et al.*; 1998) observaron que el agregan era más frecuente en las

bandas anterior y posterior que en la zona intermedia. Esta idea refuerza los hallazgos de Mills *et al.* (Mills *et al.*; 1994), quien determinó una mayor concentración de GAG en las bandas del disco. Detamore (Detamore *et al.*; 2005) observó lo contrario en cuanto a la distribución de agregan.

Otros proteoglucanos, compuestos por dermatán sulfato, son el biglican y decorin. Decorin se observó que era más prevalente en la región anterior y la región de transición con la zona central (Mizoguchi *et al.*; 1998). Biglican era más frecuente en la región posterior (Mizoguchi *et al.*; 1998). Todo esto contrasta con el trabajo de Detamore (Detamore *et al.*; 2005) quien no observó proteoglucanos en las bandas anterior ni posterior.

Como se describió anteriormente, el disco articular es delgado en el tercio anterior (1,5 a 2 mm de espesor) y más grueso en los bordes periféricos (2,5 a 3 mm de grosor). La región más delgada del disco es la zona central (1 mm), que está compuesta por una densa trama de fibras colágenas, que se ordenan de forma paralela a la superficie articular, junto a la cual existen escasas células y ocasionales fibras elásticas. A este nivel no se observan vasos sanguíneos ni nervios (Gómez de Ferraris y Campos; 2009). Los componentes de la matriz extracelular (Figura 8) son los que le confieren al disco la capacidad de soportar las fuerzas compresivas, por las propiedades hidrofílicas de los proteoglucanos del tipo del condroitín sulfato y dermatán sulfato. Las fuerzas de tracción, en cambio, son soportadas por las fibras colágenas tipo I que constituyen un porcentaje elevado del total de las fibras del disco. En la región posterior el disco, como indicamos anteriormente, se hace bilaminar y está compuesto por dos fascículos. El fascículo posterosuperior, más desarrollado, contiene fibras colágenas, elásticas y algunas fibras reticulares. Por el contrario, la lámina posteroinferior del disco, que se une al cóndilo es inelástica y avascular. Entre ambos fascículos queda una zona de tejido conectivo laxo con abundantes vasos sanguíneos y nervios.

El disco es flexible y posee gran adaptabilidad a los cambios que experimenta durante el normal funcionamiento articular. Esta función se encuentra mermada o anulada en determinadas patologías articulares, como sucede en el SDTM.

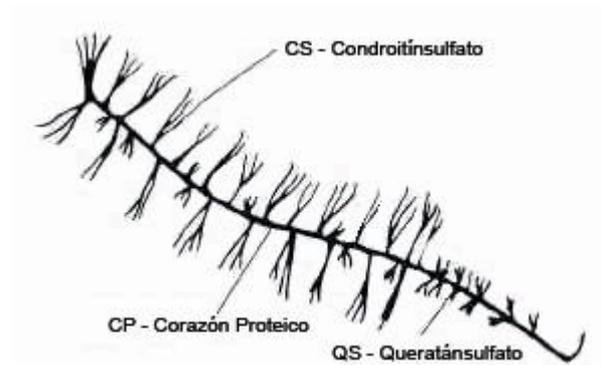


Figura 7. Representación esquemática de un proteoglicano.

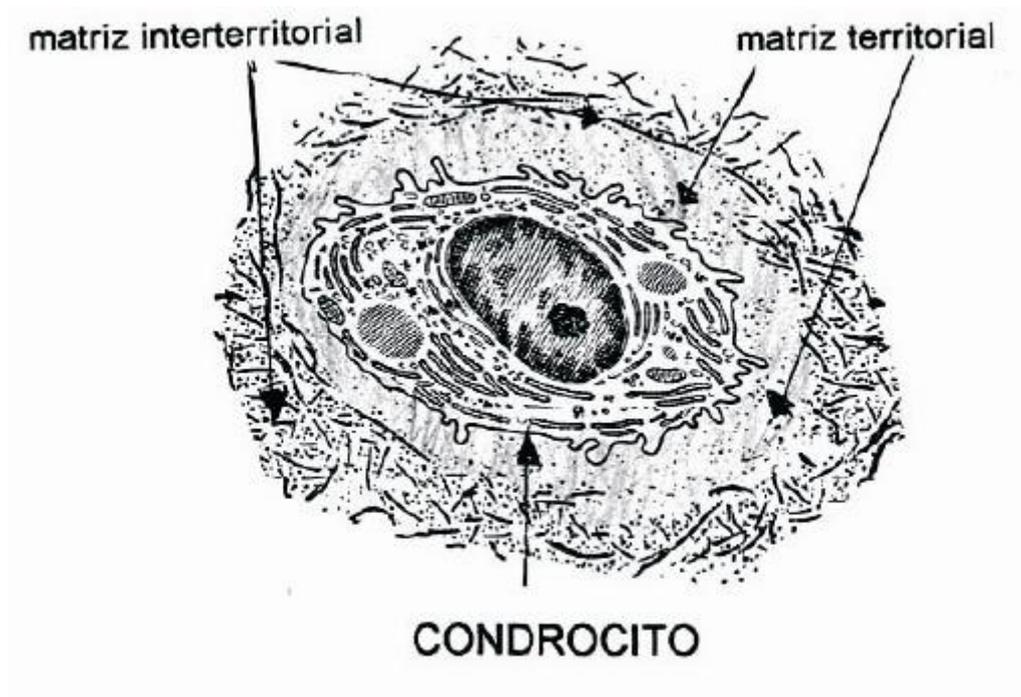


Figura 8. Representación gráfica de la matriz territorial e interterritorial.

<http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/segundo/histologia/HistologiaWeb/paginas/co24947.html>

1.3. HISTOFISIOLOGÍA ARTICULAR

El normal funcionamiento de la ATM permite que los movimientos mandibulares se realicen en las tres dimensiones del espacio de forma silenciosa, sin interferencia y sin sensación de molestia. En los movimientos masticatorios participan, además de los elementos dentarios, los músculos específicos y la ATM, regulados por guías óseas, dentarias y sensoriales. Cualquier modificación de la ATM o de la articulación dentaria puede provocar trastornos por su interdependencia funcional.

Las características topográficas de la articulación temporomandibular se encuentran en estrecha relación con la presencia o ausencia de los elementos dentarios y el tipo de dieta. Cuando existe edentulismo parcial en las dos etapas extremas de la vida de un individuo (lactante y senil), y la alimentación predominante es de consistencia líquida o semisólida, las superficies óseas de la articulación se encuentran poco desarrolladas, en especial la fosa mandibular. Por el contrario, la existencia de dientes y una alimentación mixta, determinan anatómicamente el típico aspecto de una diartrosis bicondílea.

Con la edad, las distintas estructuras articulares experimentan diversos tipos de cambios como consecuencia de una adaptación a diferentes condiciones funcionales. A partir de la etapa adulta los tejidos están sujetos al proceso natural de envejecimiento, lo que conlleva alteraciones tisulares y, por ende, disfunciones articulares.

Los cambios más frecuentes encontrados en cada una de las estructuras de la ATM son los siguientes (Gómez de Ferraris y Campos; 2009):

-Superficies articulares óseas: A partir de la quinta década de vida aproximadamente, el cóndilo, que está constituido por tejido óseo, presenta signos de osteoporosis en diverso grado, siendo más común en la mujer (por ausencia de estrógenos) que en el hombre.

A nivel de las superficies funcionales, la cubierta fibrosa que actúa como amortiguador fisiológico junto con el disco se vuelve de menor espesor.

-Disco articular: Con la edad el disco presenta áreas condroides especialmente en las zonas de mayor presión. Además, puede observarse áreas de hialinización, acumulación de agua y degeneración de las fibras colágenas, que de forma irreversible conduce a la pérdida progresiva de extensibilidad. En la

región retrodiscal se aprecia como las paredes de los vasos aumentan de grosor.

-Membrana sinovial: El número de vellosidades aumenta con la edad y, particularmente, en estados patológicos (artrosis) lo que, junto al aumento de células adiposas, conduce a una disminución en la producción de líquido sinovial y, por lo tanto, a una reducción en el nivel de lubricación de las superficies articulares.

-Cápsula articular: En los individuos de edad avanzada el tejido conectivo de la cápsula y de los ligamentos posee menor cantidad de capilares y nervios, volviéndose fibroso y, de esta manera, limitando los movimientos articulares.

-Músculos masticadores: Los músculos masticadores involucionan a partir de los sesenta y cinco años, perdiendo considerablemente su eficacia funcional.

1.4. BIOMECÁNICA ARTICULAR

Tal y como se ha comentado previamente, la ATM es una articulación doble bicondílea que dispone básicamente de tres movimientos necesarios para la masticación: apertura y cierre, protrusión y retrusión y laterodesviación.

Movimientos de ascenso-descenso o apertura y cierre

Los *movimientos de ascenso-descenso*, también denominados movimientos de apertura y cierre, son los de mayor importancia y resultan de la combinación de dos tipos de desplazamientos:

-Un movimiento de rotación de los cóndilos en la articulación meniscomandibular.

-Un movimiento de traslación anteroposterior de los cóndilos mandibulares en la articulación temporomeniscal.

El movimiento de apertura y cierre mandibular se realiza a través de la rotación sincronizada de ambos cóndilos a través de un eje transversal ó “eje de bisagra”, de tal forma que el desplazamiento anterior del complejo disco-cóndilo asegura la máxima apertura oral.

En el movimiento de apertura oral participan los siguientes elementos:

-Articulación meniscomandibular ó “complejo disco-cóndilo”

Se trata de un sistema compuesto por los tejidos que rodean la cavidad sinovial inferior, donde los ligamentos medial y lateral unen fuertemente el disco al cóndilo, de forma que el único movimiento posible entre estas dos superficies es la *rotación* del disco sobre el cóndilo. Este movimiento de rotación que se produce en el espacio articular inferior y es el responsable del inicio de la apertura oral (los primeros 20 mm). De esta forma, el cóndilo realiza una rotación alrededor de un eje transversal de unos 15°. La proyección anterior del menisco está frenada por la tensión de la banda discal posterior.

-Articulación temporomeniscal

El segundo sistema lo forman el complejo disco-cóndilo y la superficie articular de la fosa glenoidea (cavidad sinovial superior). En este punto no existe una unión fuerte del disco a la fosa, permitiendo, de esta manera, el

libre desplazamiento entre ambos (movimiento de traslación). Mediante este movimiento se consigue la mayor apertura oral y, simultáneamente con el movimiento de rotación condilar, se produce un desplazamiento del cóndilo hacia adelante junto al disco, el cual se encuentra fijo. En reposo, el disco está ubicado entre la cavidad glenoidea y la vertiente anterior del cóndilo mandibular. Con el movimiento de apertura oral se desplaza en dirección ventrocaudal en relación al cóndilo.

Mediante este movimiento se consigue completar la apertura oral, consiguiéndose una amplitud de movimiento de 45-55 mm.

El movimiento global de apertura está limitado por la tensión del ligamento lateral externo y por los músculos de cierre.

Al igual que el cóndilo, el disco se desplaza, pero a mayor distancia y más rápidamente por la tracción de los elementos periarticulares.

-Músculos motores de la apertura oral

En primer lugar se contraen los músculos pterigoideos externos o laterales (Figura 9), músculos esenciales de la apertura oral. Inicialmente se relaja el haz superior esfenoidal, mientras que se contrae el haz inferior (Chouraki; 1986). Según Shinishi, 1997 (Shinishi *et al.*; 1997), el pterigoideo externo no se contraería en su totalidad ya que tiene dos acciones, anteriorizar y posicionar el disco. Sin embargo, otros estudios muestran que no se precisa de la contracción superior del haz superior del pterigoideo externo para desplazar el disco anteriormente (Devocht; 1993).

Posteriormente, asistimos a la contracción del haz anterior del músculo digástrico (Figura 9), que ejerce una acción de arrastre sobre la mandíbula hacia abajo y atrás, tomando el hioides como punto de apoyo y estando éste estabilizado por los músculos infrahioides. Esta acción que se mantiene desde la posición de intercuspidad hasta la de reposo y que precedería en 100 ms la acción del músculo pterigoideo. Simultáneamente, el músculo milohioideo se encuentra igualmente activo.

Igualmente, vamos a describir los elementos articulares y musculares involucrados en el movimiento de cierre oral.

Desde la posición de apertura oral, la mandíbula asciende describiendo una trayectoria inversa al recorrido de apertura. Para ello, es necesario un deslizamiento posterior del cóndilo seguido de un movimiento de charnela. En este movimiento existen dos posibilidades:

-La mandíbula se aplica contra el maxilar superior en forma de “oclusión cerrada” (posición intercuspídea).

-Se produce un contacto de los incisivos centrales de ambos maxilares borde a borde (oclusión incisiva).

-Músculos motores del cierre oral

Dentro de los músculos que desarrollan el movimiento de cierre oral encontramos los músculos maseteros, temporales, pterigoideos internos (Figura 10) y los haces superiores de los pterigoideos externos, que fijan el disco sobre el cóndilo y mantienen una relación armónica entre las distintas estructuras. El ligamento esfenomandibular actuaría arrastrando pasivamente la parte posterior del disco (Devocht; 1993).

Movimientos de propulsión-retropulsión

Los *movimientos de propulsión-retropulsión* tienen lugar en la articulación meniscotemporal. Dicho movimiento se realiza mediante del desplazamiento de complejo meniscotemporal de delante hacia atrás. En la evaluación del mismo hemos de tener en cuenta que, debido a la inclinación anteroposterior de la superficie articular craneal, ambos cóndilos descienden cierta altura durante la antepulsión (movimiento de Walter) en relación a su desplazamiento anterior (movimiento de Bonwill). Dicho movimiento ventrocaudal recibe el nombre de trayectoria condílea sagital, que oclusalmente coincide con una desoclusión posterior (movimiento de Christensen) (Christensen; 1995).

El movimiento de propulsión se produce al desplazarse la mandíbula hacia adelante en relación a la arcada dental superior. Se produce con o sin contactos dentales, presentando una amplitud máxima de 1,5 cm, siendo ésta menor cuando el movimiento se realiza con la boca abierta por la acción de los ligamentos estilomandibulares y esfenomandibulares. Presenta como principal límite la tensión de la banda discal posterior. Actúan como músculos motores los pterigoideos externos e internos (Figura 11), que actúan arrastrando hacia

adelante el complejo “cóndilo-disco” y el músculo temporal que sostiene la mandíbula.

El movimiento de retropulsión es el movimiento que deshace al anterior colocando la mandíbula en posición de oclusión centrada. Es un movimiento de pequeña amplitud al encontrarse limitado por la compresión de los elementos retromandibulares. Actúan el haz posterior del músculo digástrico, actuando sobre el hioides, los haces profundos de los maseteros y los haces posteriores de los músculos temporales y de los genihioideos.

Los *movimientos de diducción* son los movimientos de laterodesviación mentoniana, que alcanzan una amplitud de 10-15 mm. Son movimientos de abducción y adducción que precisan de la dislocación mandibular mediante la actuación de la musculatura contralateral del lado que se moviliza (músculos pterigoideos internos y externos). En el momento en el que la barbilla se desplaza hacia un lado, el cóndilo homolateral gira sobre su eje longitudinal (movimiento de Bennet) mientras que el cóndilo contralateral (ó cóndilo de balanceo) lo hace hacia adelante, abajo y hacia dentro del compartimento temporodiscal. En este tipo de movimiento participan las fibras posteriores y mediales del músculo temporal homolateral y los músculos pterigoideos externo e interno contralaterales, así como las fibras anteriores del músculo temporal contralateral.

Biomecánica articular

La presión en la cavidad articular varía en función de la actividad muscular, de forma que al aumentar la actividad muscular, el cóndilo es empujado contra el disco y éste contra la fosa, disminuyendo el espacio articular y aumentando la presión intraarticular. Para la realización de estos movimientos se precisa que el disco articular cambie su posición, de tal forma que en posición de reposo, la tonicidad del músculo pterigoideo lateral mantiene al disco en posición anterior respecto al cóndilo, de forma que solo contacta con la porción más posteromedial del disco. Cuando el cóndilo se desplaza anteriormente se activa la fuerza de retracción de la lámina retrodiscal, se vence la tonicidad del músculo pterigoideo lateral rotando el disco en dirección posterior.

Durante una mordida potente, el pterigoideo lateral desplaza el cóndilo anteriormente para que la porción posterior más gruesa ocupe el espacio articular aumentado. De este modo, la acción del músculo rotando el disco

hacia adelante ayuda a mantener contacto entre las superficies articulares, protegiendo la articulación de una posible dislocación y aportándole una mayor estabilidad. En estas situaciones de “mordida potente” la fuerza se aplica directamente sobre el alimento, el cual actúa a modo de “elemento amortiguador”, disminuyendo la presión intraarticular homolateral y aumentando la presión en el espacio articular contralateral. Durante el ejercicio del movimiento masticatorio, coincidiendo con la descomposición del alimento, las fuerzas masticatorias recaen sobre las cúspides dentarias y se produce un aumento en la presión intraarticular de la articulación en ejercicio que provoca una rotación mecánica del disco para adaptarse al espacio articular reducido.

En la biomecánica normal de la ATM hemos de señalar dos hechos de interés:

-Los movimientos adaptativos del disco durante la función articular dependen en gran medida de la morfología normal del disco, de manera que cuando ésta se modifica, la biomecánica articular se ve alterada, apareciendo los signos de disfunción articular.

-Los ligamentos articulares, al tratarse de estructuras poco elásticas, actúan de forma pasiva en los movimientos de la ATM, restringiendo unos movimientos y permitiendo otros. Este dato es importante, ya que una excesiva presión sobre los mismos puede inducir su elongación y alterar de este modo la normal funcionalidad de la ATM.

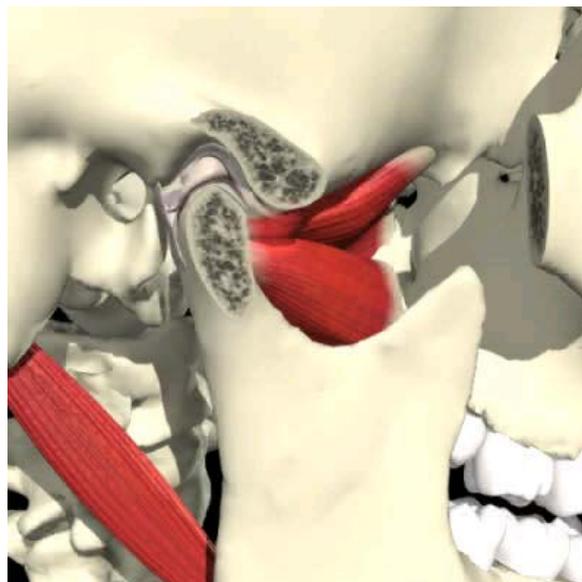


Figura 9. Representación gráfica de la musculatura involucrada en el movimiento de apertura oral (músculo pterigoideo lateral y músculo digástrico).

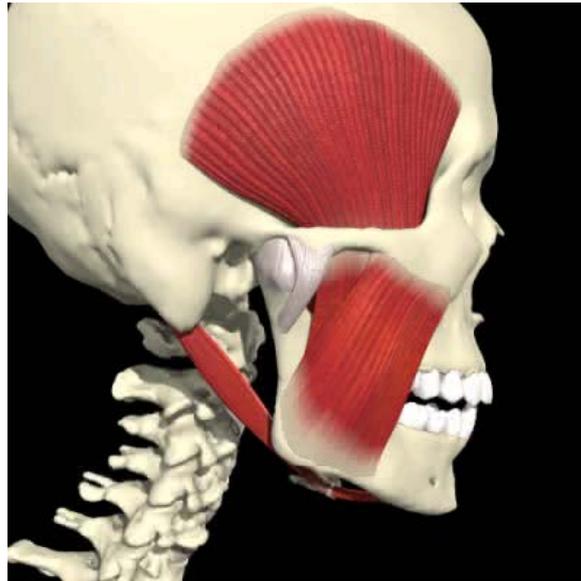


Figura 10. Representación gráfica de la musculatura involucrada en el movimiento de cierre oral (músculo temporal y músculo masetero).

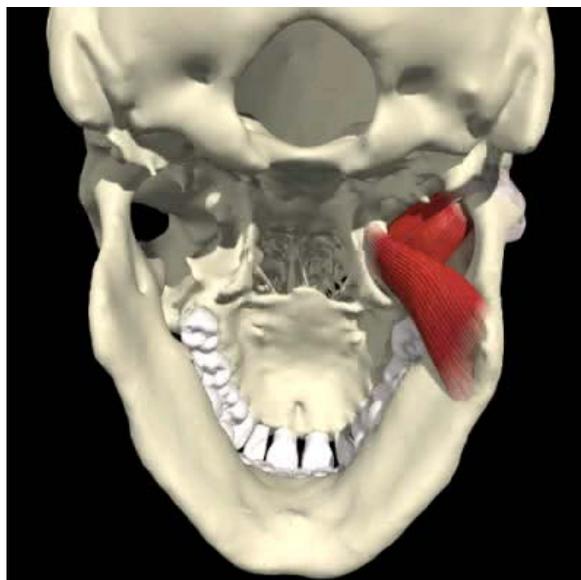


Figura 11. Representación gráfica de la musculatura involucrada en el movimiento de protrusión mandibular (músculo pterigoideo lateral y medial), apertura oral (músculo pterigoideo lateral) y cierre oral (músculo pterigoideo medial).

1.5. FISIOPATOLOGÍA ARTICULAR

Las alteraciones de la ATM habitualmente siguen una serie de etapas que conforman una escala cronológica predecible pero que no siempre significa que sea progresiva. De hecho, estadísticamente pocos pacientes progresan a la siguiente etapa siendo la mayoría los que permanecen en una misma fase. El interés clínico radica en detectar la fase del trastorno y en función de la misma determinar el tratamiento más adecuado.

De forma progresiva, la secuencia de acontecimientos que acontecen en una disfunción de ATM se podría sistematizar en:

-Articulación sana.

-Pérdida de la relación normal disco-cóndilo como consecuencia de un macrotrauma ó microtraumatismos de repetición (de ahí la importancia clínica de detectar alteraciones neuromusculares, oclusales, etc.).

-Aparición de movimientos de traslación entre el disco y el cóndilo.

-Fenómenos histopatológicos discales con un adelgazamiento de la porción posterior del mismo, elongación de los ligamentos discales y retrodiscales.

-Desplazamiento funcional del disco hacia adelante provocando fenómenos clínicos tales como “chasquidos”.

-Luxación discal con ó sin reducción.

-Degeneraciones discales con o sin alteraciones subyacentes del cóndilo.

1.5.1. Síndrome de Disfunción Temporomandibular

Tal y como se mencionó al comienzo de la presente tesis, este trastorno fue definido por Dolwick en 1983 como una relación anormal del disco articular respecto al cóndilo, fosa y eminencia de la articulación temporomandibular. Se trata de una patología de origen multifactorial caracterizada por una alteración en la relación disco-cóndilo mandibular, como consecuencia de la cual tiene lugar un desplazamiento del disco, generalmente en sentido anterior. El término de desarreglo interno no incluye solo el desplazamiento discal, sino también la presencia de cuerpos libres, adherencias, enfermedades degenerativas o inflamatorias, etc.

1.5.1.1. Epidemiología

Se trata de una enfermedad muy frecuente, en la que hasta un 75% de la población ha podido presentar algún signo de la enfermedad en un momento de su vida. Sin embargo, solo el 5% requieren tratamiento. Estudios estadísticos muestran que el desplazamiento del disco articular aparece hasta en un total del 15% de voluntarios jóvenes sanos.

Afecta preferentemente a pacientes en la tercera década de la vida, seguido de la cuarta y la segunda, con un claro predominio en el sexo femenino (9:1).

1.5.1.2. Etiopatogenia

Los factores etiológicos involucrados clásicamente en el desplazamiento del disco se pueden agrupar en factores predisponentes (factores psicoemocionales, como el estrés o la ansiedad, artritis degenerativa, trastornos del desarrollo o el bruxismo) y factores iniciadores y perpetuadores, entre los que se encuentran: traumatismos agudos, sobrecarga funcional, laxitud articular, osteoartritis degenerativa, espasmo muscular masticatorio y aumento de la fricción entre ambas superficies articulares, fenómeno relacionado especialmente con el bruxismo severo y con alteraciones en el ácido hialurónico.

Nitzan en 2001 (Nitzan; 2001) concede al sistema de lubricación de la articulación un papel fundamental en la cadena de acontecimientos que llevan al desplazamiento discal. En una articulación sana, los fosfolípidos activos de superficie constituyen el lubricante o surfactante de los límites y el ácido hialurónico actúa como lubricante de la interfase y protege a los fosfolípidos de la degradación por la fosfolipasa A2 del espacio articular. La presión intraarticular en reposo en sujetos sanos oscila entre -4 y -10 mmHg. Con los movimientos articulares aumenta la presión intraarticular, que puede llegar a ser positiva. Cuando la presión en la cavidad articular varía, lo hace del mismo modo el espacio articular. El disco cambia de posición y se deforma para adaptarse a estas variaciones de presión y espacio. Cuando supera los 40 mmHg se hace mayor que la presión de perfusión capilar, desencadenando hipoxia. En respuesta a esta hipoxia tiene lugar una alteración en el metabolismo celular. El flujo sanguíneo a las áreas afectas se reestablece por movimientos maxilares que disminuyen la carga mecánica. La reperfusión con aporte de oxígeno a las células sometidas previamente a la hipoxia genera la producción de radicales libres que ponen en marcha una cadena de reacciones de oxidación-reducción

ocasionando la degradación del ácido hialurónico que protege a los fosfolípidos de superficie de su degradación por la fosfolipasa A2, generando una lesión o una solución de continuidad en la capa límite del surfactante, lo que produce un aumento de la fuerza de rozamiento. Esto provoca que, durante la apertura oral, cuando el cóndilo se desplaza anteriormente, el disco tienda a quedarse retenido por el rozamiento y no acompañe al cóndilo, con una elongación progresiva de las fibras que anclan ambas estructuras.

El disco, cada vez más móvil, va luxándose en dirección anterior y medial.

1.5.1.3. Clínica

Entre los síntomas y signos característicos se encuentran (Kopp; 1995):

-Dolor. Localizado en la región preauricular, y señalado “a punta de dedo”. Puede acompañarse de chasquido o no.

-Chasquido recíproco. Se produce al ser recapturado el disco por el cóndilo, traduciendo un desplazamiento discal con reducción, si bien conviene descartar otras causas tales como cuerpos libres intraarticulares, hipermovilidad articular, etc. Una mayor tardanza en la aparición del chasquido traduce mayor elongación de la banda posterior y, por tanto, un estadio clínico más avanzado.

-Crepitación. Es un ruido de roce que se asocia a la osteoartritis degenerativa y a la perforación discal, si bien no se ha podido determinar una relación directa con el desplazamiento de éste (Wildmalm; 1992).

-Limitación de la apertura oral. Puede relacionarse con una crisis de dolor miofascial o traducir un bloqueo articular en un desplazamiento discal no reducible. En este caso será de aparición brusca y coincide con la pérdida del chasquido y el desplazamiento mandibular al lado afecto.

1.5.1.4. Fisiopatología discal

En referencia al SDTM y a la fisiopatología discal distinguimos tres tipos fundamentales de lesión en relación con las alteraciones biomecánicas del disco:

-Luxación reducible: Situación en la que al empezar a abrir la boca el cóndilo sobrepasa el borde posterior del disco desplazado (reducción)

generándose un ruido o click al impactar el cóndilo contra la zona central del disco. Al cerrar la boca el cóndilo llega a perder el contacto con el disco y se escucha otro ruido (click recíproco) (Figura 12). Cuanto más tardío sea el chasquido de apertura, más elongado estará el ligamento posterior y más avanzado será el estadio. Esto hace que gradualmente el cóndilo vaya ocupando una posición más posterior hasta que en la apertura no llega a sobrepasar el margen posterior del disco desplazado (luxación no reductible).

-Luxación no reductible: Estado en el que desaparecen los ruidos de apertura y cierre y ocurre una marcada limitación de la apertura oral (25-30 mm). Es una fase patológica en la que a medida que avanza aparece un silencio sintomático de empeoramiento. En esta situación a veces ocurre una metaplasia del tejido retrodiscal que se comporta como un pseudodisco y mejora la apertura oral (35-40 mm).

-Síndrome del disco anclado: Es una entidad clínica diferente a la luxación no reductible. Aparece de forma repentina con una limitación de la apertura más importante (15-20 mm), sin haber existido necesariamente una historia previa de clicks o ruidos articulares. Es un diagnóstico radiológico, al comprobar que la posición de la banda anterior del disco no varía de boca cerrada a boca abierta (ya que está anclado a la eminencia en todo el recorrido del cóndilo).

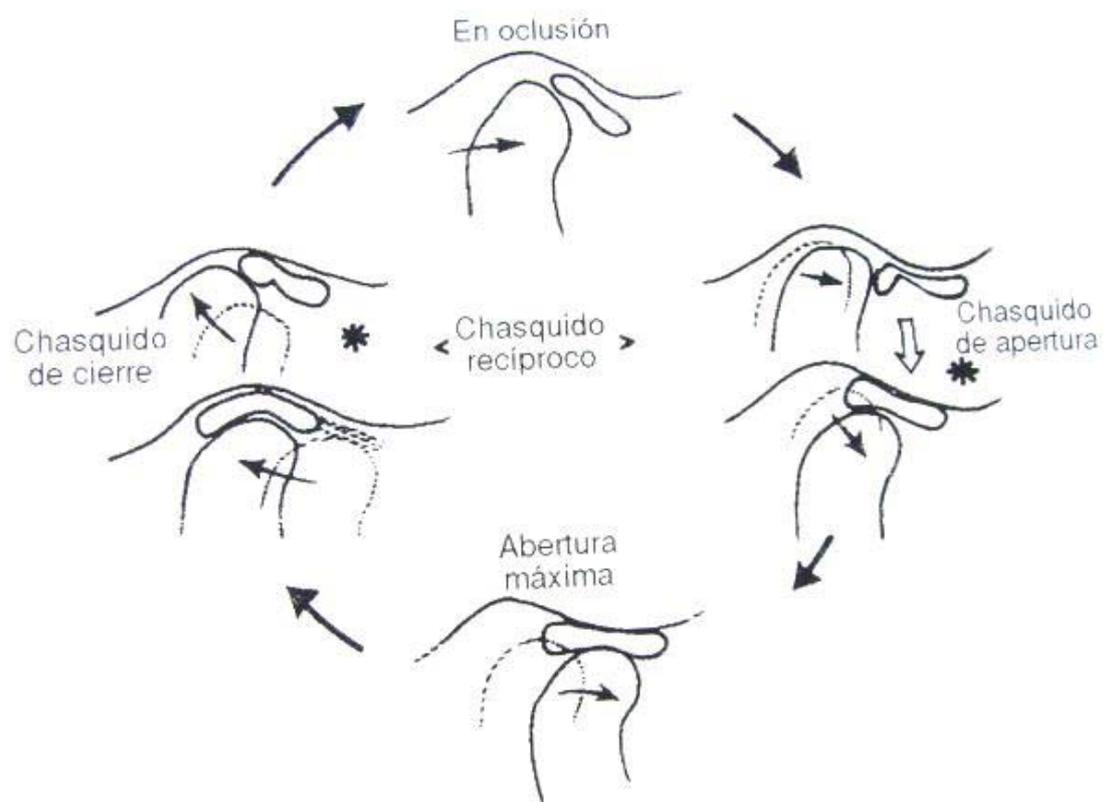


Figura 12. Representación de los cambios discales en una luxación discal reductible.

1.5.1.5. Diagnóstico

La primera exploración que debe solicitarse es la ortopantomografía para el despistaje inicial de un gran número de patologías, aunque en el síndrome de disfunción temporomandibular solo mostrará cambios en estadios avanzados. La prueba de imagen de elección para valorar la forma y posición del disco es la resonancia magnética (RMN). A su vez, nos permite valorar otros componentes articulares y periarticulares y visualizar la vascularización. Con secuencias potenciadas en T2, se puede ver el edema de medula ósea, el derrame articular o la hipervascularización que traducen fenómenos inflamatorios.

1.5.1.6. Estadiaje

El estadiaje del SDTM o estadios de desplazamiento discal de Bronstein Merril-Wilkes (Wilkes; 1989) son los siguientes:

1.-Estadio I (Fase Temprana).

- Clínica: Asintomático, con la excepción de chasquido recíproco, inicial en la apertura y tardío en el cierre.
- RMN: Bloqueo discal reversible. Ausencia de hallazgos radiológicos.
- Hallazgos quirúrgicos (artroscópicos): Anatomía normal. Roofing (cantidad de disco que cubre el cóndilo) del 80-100%. Incipiente elongación de la banda posterior.

2.-Estadio II (Fase Temprana/Intermedia).

- Clínica: Chasquido más intenso, especialmente en la apertura.
- RMN: Bloqueo discal reversible. Signos degenerativos incipientes (engrosamiento discal en su porción posterior).
- Hallazgos quirúrgicos (artroscópicos): Deformidad discal temprana (muy similar a los hallazgos del estadio II). Roofing del 50-100%. Sinovitis. Elongación de la zona bilaminar.

3.-Estadio III (Fase Intermedia).

- Clínica: Aumento de la frecuencia del chasquido. Bloqueos articulares no reversibles que se traducen en problemas mecánicos (chasquidos). Dolor a la palpación en ATM y región temporal.

- RMN: Bloqueo discal reversible y no reversible. Cambios degenerativos en la zona retrodiscal.
- Hallazgos quirúrgicos (artroscópicos): Marcada deformidad. Adherencias en los recesos anterior, posterior y lateral. Roofing de 5-15%. Elongación posterior “en acordeón”. Sinovitis prominente. Condromalacia grado II/III.

4.-Estadio IV (Fase Intermedia/Tardía)

- Clínica: Iguales síntomas que en el estadio anterior pero marcados por la cronicidad.
- RMN: Cambios degenerativos en tejidos duros y aparición de signos en TAC.
- Hallazgos quirúrgicos (artroscópicos): Cambios degenerativos (osteofitos, adherencias). Ausencia de perforación discal. Condromalacia III/IV. Hialinización del anclaje posterior.

5.-Estadio V (Fase Tardía).

- Clínica: Crepitaciones. Marcada limitación a apertura oral. Bloqueos de carácter continuo.
- RMN: Perforación discal.
- TC: Osteofitos, esclerosis subcondral.
- Hallazgos quirúrgicos (artroscópicos): Marcadas deformidades. Condromalacia Grado IV. Perforación posterior, sinovitis avanzada.

1.5.1.7. Terapéutica

El enfoque terapéutico del síndrome de disfunción temporomandibular debe ser multidisciplinar, con la colaboración de distintos especialistas. Además, debe ser un tratamiento escalonado.

1.-*Tratamiento conservador.* Puede ser suficiente en más del 80% de los pacientes (Sidebottom; 2009). Reposo articular (indicado en las fases más agudas del dolor acompañadas de inflamación), dieta blanda, férulas oclusales (el mecanismo de acción no está claro, pero parece tener que ver con factores como el control de la hiperactividad muscular, lo que se traduce en una disminución de la presión intraarticular), control del estrés, relajantes musculares, analgesia (antiinflamatorios no esteroideos, anestésicos locales intraarticulares, anestésicos locales intramusculares para disminuir el espasmo muscular, inyección intramuscular de toxina botulínica).

2.-*Cirugía mínimamente invasiva*. Su empleo comienza en 1975 cuando Onishi (Onishi; 1975) realiza la primera artroscopia en esta articulación. Las distintas modalidades de cirugía mínimamente invasiva son consideradas por la mayoría de los autores como el tratamiento quirúrgico inicial en el síndrome de disfunción temporomandibular:

-Artroscopia: debe llevarse a cabo bajo anestesia general para obtener la máxima relajación muscular. Constituye un método diagnóstico-terapéutico. Consiste en la introducción de un sistema óptico en la articulación, generalmente en el espacio superior (vía posterolateral), y aportar una vía de salida para el suero de irrigación (vía intermedia). En caso de ser necesario el uso de otros instrumentos se colocará una tercera vía anterior (triangulación). Permite visualizar, estadiar y tratar alteraciones internas y valorar el grado de desplazamiento del disco (Figura 13). Cuando existe desplazamiento discal se pueden realizar distintas maniobras como la miotomía anterior, coagulación de la banda posterior o sutura artroscópica meniscal. Las complicaciones son infrecuentes, con una incidencia variable entre el 1,7 y el 10,3%. Entre las más frecuentes se encuentran el daño de las superficies articulares y la extravasación del líquido de lavado. En cuanto a las indicaciones, parece claramente indicada en estadios intermedios del síndrome de disfunción temporomandibular con dolor en los que ha fracasado el tratamiento conservador durante al menos seis meses, en el bloqueo discal crónico y en el síndrome de disco anclado crónico. También se ha demostrado eficaz en estadios precoces de sinovitis y en osteoartritis que no responden al tratamiento conservador. El manejo postoperatorio incluye dieta blanda, antiinflamatorios, reposo articular, crioterapia las primeras 24-48 horas, férula miorrelajante y movilización de la articulación a partir del primer o segundo día de la intervención.

-Artrocentesis: Consiste en un procedimiento de aumento de la presión intraarticular por punción (lisis-lavado) mientras se realiza la manipulación articular (Figura 14). Se realiza bajo anestesia local. Tiene indicación clara en bloqueos agudos (con tasas de éxito entre 70 y 100%) y en el síndrome del disco anclado.

3.-*Cirugía abierta*: Artrotomía (Figura 15). Se emplea solo en casos seleccionados. El abordaje debe conservar la estética y respetar el nervio facial y sus ramas. Las diferentes técnicas disponibles aportan una descompresión de la articulación, lo que podría suponer por si solo una mejoría. Respecto a cuál

de las diferentes técnicas de cirugía abierta es la más adecuada en estos pacientes existe aún cierta controversia en la literatura.

Este tipo de cirugía permite la reconstrucción total o parcial del complejo articular mediante el empleo de materiales autólogos (injerto condrocostal, cresta ilíaca) ó materiales heterólogos (silastic, Teflon, etc.). Dentro de las más novedosas técnicas reconstructivas de la ATM, figura el empleo de prótesis articulares (parciales ó totales), describiéndose tasas de éxito de hasta el 90% con las prótesis articulares de última generación.



Figura 13. Imagen de artroscopia de la articulación temporomandibular, donde se aprecia el disco articular luxado anteriormente y la zona retrodiscal.

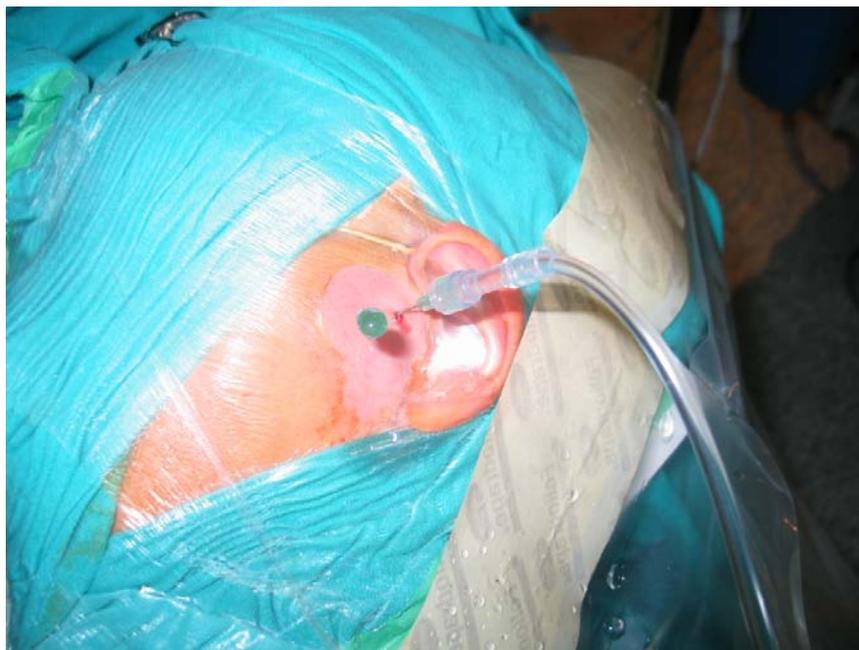


Figura 14. Artrocentesis de la articulación temporomandibular.

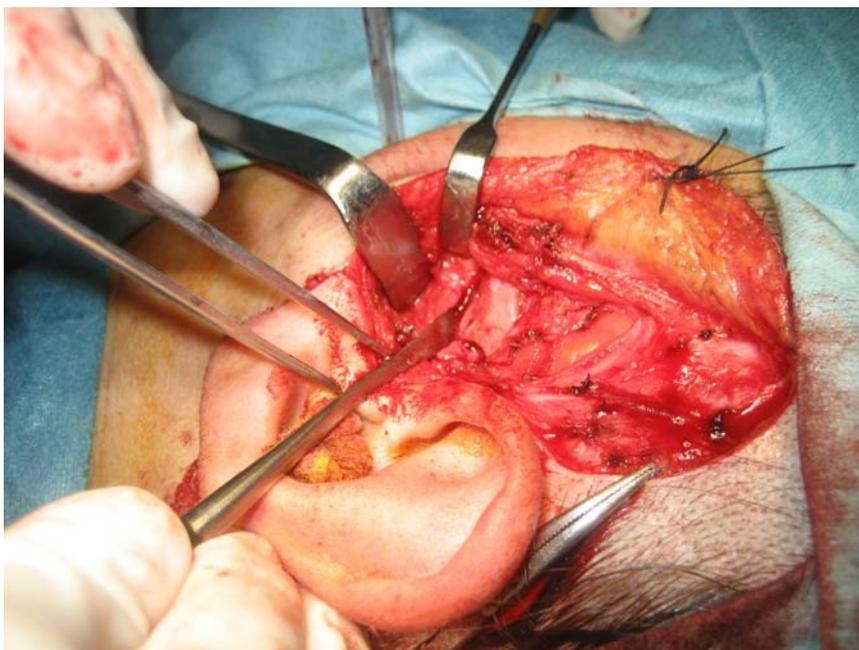


Figura 15. Cirugía abierta de la ATM (artrotomía).

1.6. PROCEDIMIENTOS RECONSTRUCTIVOS DE LA ARTICULACIÓN TEMPOROMANDIBULAR. CONTROVERSIA ACTUALES

En determinadas patologías, tales como la anquilosis fibroósea articular, artritis reumatoide ó SDTM en estadios III y IV de Wilkes, es necesario contemplar distintos procedimientos de sustitución del complejo articular que abarcan desde procedimientos iniciales, tales como la discopexia, hasta la sustitución total de la articulación mediante elementos protésicos.

Dichas técnicas reconstructivas se fundamentan en la reparación parcial ó total de la articulación empleando materiales autólogos ó heterólogos, precisando en cualquier caso de una técnica de cirugía abierta (artrotomía).

A continuación, revisaremos los distintos procedimientos y las controversias terapéuticas en torno de los mismos.

1.6.1. Conceptos generales

La elección del procedimiento reconstructivo, así como el empleo de materiales aloplásticos, alogénicos o autógenos, ha de venir regido por cuatro principios básicos (Mercuri; 1998).

- 1.-Mejorar la funcionalidad articular.
- 2.-Reducción de la sintomatología.
- 3.-Prevenir el “sobretatamiento” y evaluar los costes.
- 4.-Reducir la morbilidad.

En cualquier caso, tal y como establece Mercuri en 1999 (Mercuri; 1999), el objetivo primordial del tratamiento será la restauración anatómica y funcional de la articulación evitando, en la medida de lo posible, la aparición de sintomatología (dolor, limitación de la apertura oral, etc.) secundaria a dicho tratamiento.

1.6.2. Discopexia

-Indicaciones. Considerada como la técnica quirúrgica más frecuente en cirugía abierta, está indicada en los casos de desplazamiento discal no reductibles con tratamiento conservador (estadios III y IV), dolor refractario y reabsorción condilar.

-Procedimiento. Una vez practicada la artrotomía, se procede a la sección

de una cuña posterolateral a nivel del ligamento posterior y se reposiciona el disco articular. Precisa previamente de un “shaving” ó regularización ósea para eliminar posibles osteofitos, anclándose el disco mediante puntos de sutura no reabsorbibles (Figura 16). Para evitar la recidiva se ha introducido la novedosa técnica de Mitek mini anchor® (Borja; 1996). Consiste en un cuerpo cilíndrico con un ojal de aleación de titanio (titanio-aluminio-vanadio) de 1.8 mm de diámetro y 5 mm de longitud con 2 aletas de níquel-titanio (Nitinol®), de tal manera que al introducirse en el hueso las aletas se deforman anclándose a la medular y fijando el disco mediante una sutura no reabsorbible.

1.6.3. Discectomía

-Indicaciones. Anquilosis fibrosa ó fibroósea, sustitución del disco articular de forma aislada o como tratamiento complementario a una sustitución total articular secundaria a trastornos congénitos postraumáticos, resecciones tumorales ó procesos degenerativos.

-Procedimiento. Consiste en la extirpación del disco articular degenerado. En estos casos es necesario la recolocación de un neodisco entre las superficies articulares en condiciones ideales de biocompatibilidad y resistencia. Para cumplir tales medidas se han empleado dos tipos de materiales:

1. Heterólogos: Proplast-Teflón, Vitek, Houston, TX ó Silastic, Dow Corning, Arlington, TX, etc. Materiales actualmente en desuso por la alta tasa de recidivas y complicaciones postoperatorias (infección, migración de material, rechazo, etc.) (Henry; 1993), (Black; 1984).

2. Autólogos: indicados de forma primaria y secundariamente a fracasos de materiales heterólogos. Se han incluido distintas técnicas siendo las más destacables las que describimos a continuación:

- Colgajo pediculado de músculo temporal asociando fascia y pericráneo (Figura 17). Descrito por Feinberg en 1992, constituye una razonable alternativa a la sustitución del disco articular desde el punto de vista estético y funcional. Estudios posteriores han comprobado que, años después, las fibras del músculo temporal mantienen su vitalidad, si bien se detectan eventuales signos de atrofia neurológica y sustitución de fibras musculares por tejido graso.

- Injertos de piel, cartílago auricular (Figura 18 y 19), fascia temporal y gálea (Matukas; 1990), (Tucker; 1986). Constituyen una alternativa al procedimiento anterior dependiendo del grado de destrucción articular y de las preferencias quirúrgicas. Estudios realizados con cartílago auricular en animales de experimentación muestran la viabilidad de las células cartilaginosas tras el injerto en el seno de la ATM, apreciándose en la mayoría de los casos una fusión fibrosa entre la cara superior del injerto cartilaginoso y la fosa glenoidea. No obstante, se aprecia una discreta pérdida de la celularidad cartilaginosa y, en algunos casos, puede existir erosión en la cara inferior del injerto induciendo abrasión sobre la superficie condilar. En otros casos, se ha apreciado la formación de adherencias tisulares entre el injerto cartilaginoso y la fosa glenoidea (Tucker; 1990).

Pese a que recientemente algunos autores confirman la buena funcionalidad de la discectomía con o sin material de interposición, en estudios a cinco años (Nyberg; 2004), se ha determinado, a través de estudios artroscópicos, un marcado deterioro de las superficies articulares (Holmlund; 1988).

1.6.4. Condilotomía. Sustitución articular

-Indicaciones. Procesos degenerativos severos articulares de distinta etiología (tumoraes, infecciosos, traumáticos, etc.) que precisan de la sustitución parcial o total de la articulación precisando de su posterior reconstrucción.

-Procedimiento. Tradicionalmente la sustitución articular se ha venido realizando a través de injertos osteocartilaginosos y, en los últimos años, mediante prótesis articulares. Distinguimos los siguientes tipos:

- Injertos osteocartilaginosos: inicialmente se emplearon injertos microvascularizados costales (Fukuta; 1992) y de cresta ilíaca (Taylor; 1982). Sin embargo, no existen estudios que demuestren su viabilidad a largo plazo.

Otros tejidos autólogos, tales como injertos libres de cresta ilíaca (Kummoona; 1986), clavícula y articulación esternoclavicular (Snyder; 1971), se han empleado con relativo éxito, presentando igualmente el inconveniente de que no se registra en la bibliografía estudios de seguimiento.

Sin embargo, no fue hasta 1994 cuando Wolford (Wolford *et al.*; 1994) publicaron resultados a largo plazo (con una media de 45 meses y un rango de 10-84 meses) sobre 38 pacientes sometidos a injertos esternoclaviculares en casos de artritis inflamatoria, comunicando una excelente viabilidad de los mismos basándose en criterios objetivos y subjetivos (disminución del dolor) en un 50% de los casos. La reanquilosis articular y la sustitución del injerto por prótesis articulares fue la secuela más habitual en este grupo de pacientes.

Actualmente, el empleo de injertos óseos microvascularizados de peroné (Wax; 2000), constituyen una alternativa eficaz a los anteriores, aunque los resultados a largo plazo no se han contrastado.

- Prótesis articulares. En la actualidad es una alternativa para la reconstrucción del complejo articular (Figura 20 y 21).

1.6.5. Controversias en el empleo de materiales autólogos

Tras el empleo por parte de Ionnides y Maltha en 1988 (Ionnides y Maltha; 1988) de cartílago auricular como elemento sustitutivo del disco articular, distintos autores (Takatsuka; 1996) evaluaron el comportamiento de dicho material tras practicar una discectomía en animales de experimentación (conejo), encontrando un elevado grado de fibrosis entre el cartílago y el cóndilo y la presencia de un plano fibroso con elementos cartilaginosos en la superficie articular, demostrando que el cartílago libre no era el material idóneo en la sustitución del disco articular. Resultados similares fueron refrendados por distintos autores.

Probablemente la causa de dichos resultados histológicos radique en el hecho de que biológicamente un injerto cartilaginoso, para su completa integración en el lecho receptor, requiere de una adecuada vascularización del mismo y, desafortunadamente, una articulación deteriorada y que en ocasiones ha sido sometida a distintas cirugías no reúne las condiciones idóneas que aseguren un comportamiento predecible de un injerto libre.

Tal y como muestra Lienau en 2005 (Lienau; 2005) en estudios sobre animales de experimentación, la neovascularización sobre un injerto previamente fijado presenta un límite de penetración tisular comprendido entre 180 y 220 micras, mientras que en tejidos previamente intervenidos o sometidos a distintos procesos patológicos el grosor tisular alcanza las 44 micras. Este hecho microvascular se

advierte clínicamente ante el fracaso de distintos injertos tisulares (cartilagosos, costocondrales, esternoclaviculares, etc.) como mecanismo de reemplazo discal en aquellas articulaciones sometidas a cirugías previas o en la que distintos procesos patológicos introducen un mecanismo de alteración anatómica en las mismas.

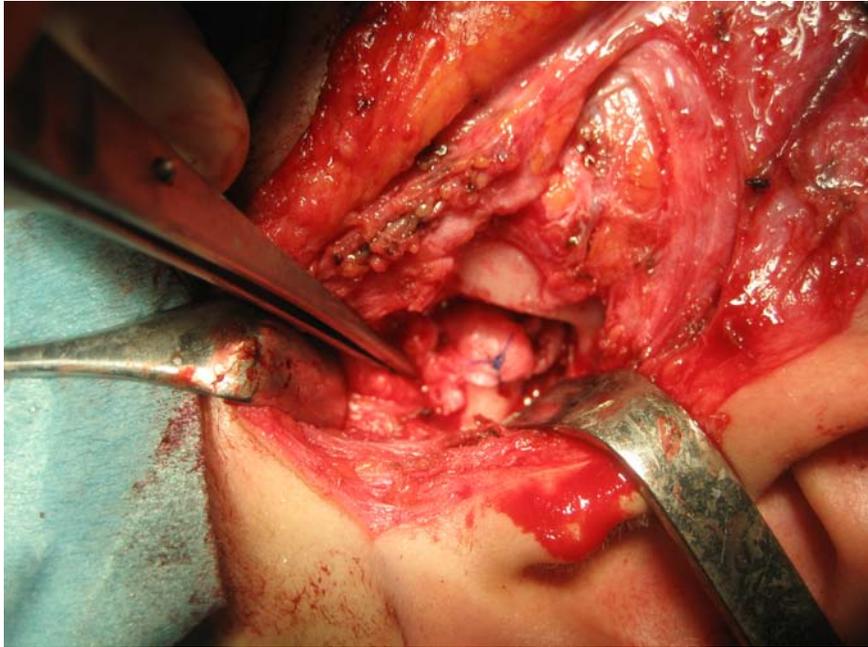


Figura 16. Discopexia

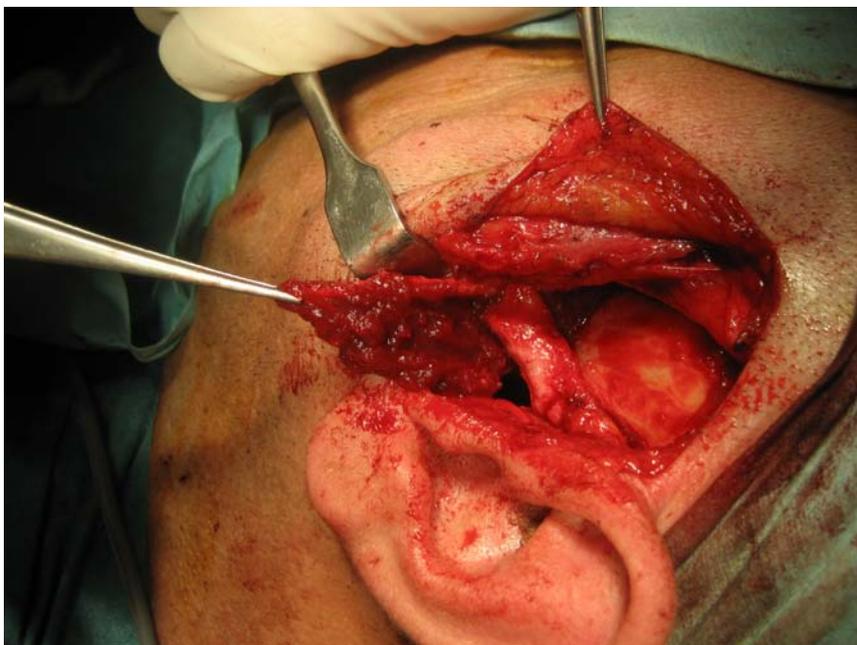


Figura 17. Discectomía y colocación de grasa autóloga como material de interposición.



Figura 18. Discectomía y colocación de cartílago auricular autólogo como material de interposición.



Figura 19. Técnica de toma de injerto de cartílago auricular autólogo.

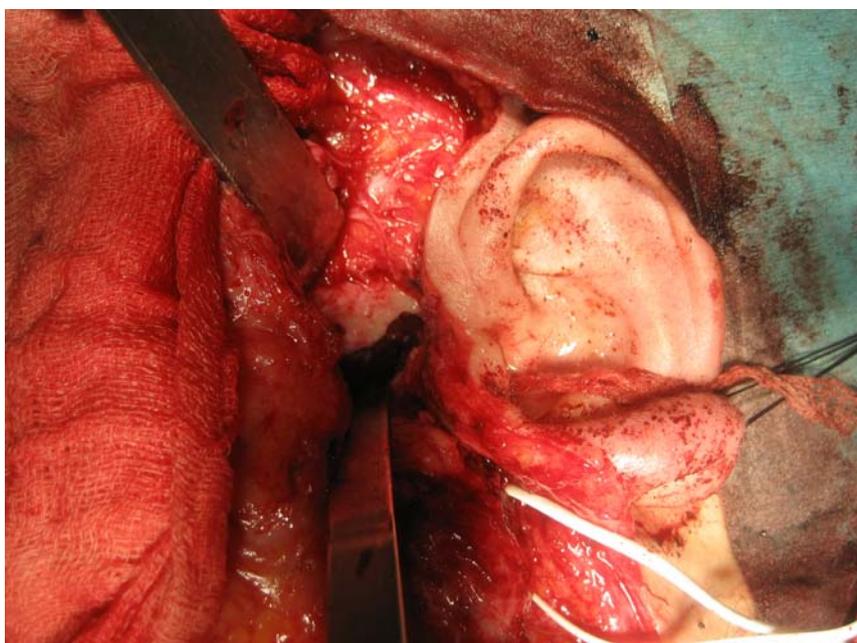


Figura 20. Retirada de prótesis articular tras el desarrollo de anquilosis articular secundaria a la colocación de la misma.



Figura 21. Prótesis articular.

2. INGENIERÍA TISULAR

2.1. CONCEPTOS GENERALES

Definimos a la Ingeniería Tisular como aquella área de la biotecnología encargada de construir equivalentes tisulares orgánicos capaces de restaurar, sustituir o incrementar las actividades anatómicas y funcionales de los propios tejidos y órganos dañados (Langer y Vacanti; 1993), (Nerem y Sambanis; 1995), (Campos; 2004). Constituye un emergente campo científico que ofrece grandes expectativas en la generación de sustitutos tisulares, intentando la fabricación *in vitro* de constructos para la posterior implantación *in vivo*.

El principio básico consiste en utilizar un andamiaje compatible biológica, estructural y mecánicamente, que será sembrado de células y cargado con moléculas bioactivas para promover la maduración y/o diferenciación celular.

La Ingeniería Tisular nace en 1933 con la implantación de células tumorales de ratón sobre una membrana de polímero biocompatible (Fuchs *et al.*; 2001). Posteriormente, los importantes trabajos de Rheinwald y Green (Rheinwald y Green; 1975 a, b y c) logran perfeccionar las técnicas de cultivo epitelial *in vitro*. Todo ello, junto con el posterior desarrollo de las técnicas de obtención de materiales hísticos biocompatibles liderada por los sustitutos dermo-epidérmicos (Bannasch *et al.*; 2005), han supuesto una revolución en la búsqueda de material autólogo capaz de sustituir el tejido primario dañado.

El término de Ingeniería Tisular fue adjudicado por primera vez a esta disciplina en la primavera de 1987, por el profesor Fung, durante una reunión anual de la Fundación Nacional de Ciencias de Estados Unidos, aunque muchas de las técnicas utilizadas en ella habían sido desarrolladas en décadas anteriores (Skalak y Fox; 1988). La idea de la Ingeniería Tisular se forjó con la unión de la experiencia ganada en diversos campos, como la biología celular, la bioquímica y la biología molecular y su posterior aplicación en la ingeniería de nuevos tejidos. El rol de la ingeniería química y biológica fue fundamental para la aplicación racional de los principios de los sistemas vivos. La tercera arma de conocimiento fue proporcionada por la terapéutica humana brindada por médicos y cirujanos.

Durante la década de los 90 el auge de la Ingeniería Tisular se ve favorecido por el empuje de numerosas empresas que ven en los nuevos productos desarrollados una potencialidad comercial fácilmente aplicable al ámbito clínico. En la actualidad, tras

años de investigación, son más de 80 las empresas dedicadas exclusivamente a la Ingeniería Tisular (Lysaght y Reyes; 2001), con una inversión económica en la última década que superó los 3.5 billones de dólares americanos y con una tendencia claramente progresiva y ascendente. El empleo clínico de epidermis y cartílago viene siendo una constante, desde su aprobación por la FDA, como constructos derivados de la Ingeniería Tisular, válidos para su empleo sanitario; en el momento actual no son muchos [piel, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, hueso, cartílago y músculo] los constructos que cuentan con aprobación para su uso terapéutico y sobre los cuales se lleva a cabo una mayor labor investigadora y de desarrollo, con la consecuente inversión económica asociada. Desde el punto de vista clínico, son dos los principales factores que justifican el rápido y necesario desarrollo de esta disciplina:

a) La necesidad de encontrar sustitutos orgánicos adecuados que permitan disminuir las listas de espera de trasplante de órganos, derivadas de la escasez de donantes.

b) La utilización de prótesis autólogas permite eliminar el riesgo de rechazo del injerto así como la utilización de inmunosupresores tras su implantación (Sher *et al.*; 1983).

Como toda ciencia en fase de expansión, existen numerosos problemas aún no resueltos, entre los que destaca la viabilidad de los cultivos celulares, la obtención de un tejido de soporte adecuado que permita su empleo en la clínica y el reto de obtener constructos viables con aporte vascular intrínseco (Langer y Vacanti; 1993), (Campos; 2004).

Mientras la Ingeniería Tisular es un área bien establecida y con grandes avances científicos, el desarrollo de esta ciencia en el campo de la ATM es aún insuficiente. Los estudios realizados se han basado principalmente en el conocimiento de las estructuras de la ATM a nivel bioquímico, celular o mecánico con el objetivo de reparar dicha articulación mediante la construcción de una estructura similar tanto anatómica como funcionalmente.

2.2. INGENIERÍA TISULAR DE LA ARTICULACIÓN TEMPOROMANDIBULAR

El tratamiento conservador del Síndrome de Disfunción Temporomandibular (SDATM), como se reflejó anteriormente, está dirigido a disminuir o evitar el aumento de presión intraarticular mediante reposo articular, dieta blanda, férulas oclusales, control del estrés, relajantes musculares, analgesia (antiinflamatorios no esteroideos, anestésicos locales intraarticulares, anestésicos locales intramusculares para disminuir el espasmo muscular, inyección intramuscular de toxina botulínica), fisioterapia articular, etc. Las opciones quirúrgicas son diversas, siendo la discectomía el tratamiento más controvertido. Dicho tratamiento está indicado en aquellos casos donde no es factible la reparación o reposición discal, englobados en los estadios evolucionados de esta patología. En estos casos de daño articular severo y, debido a la naturaleza avascular del disco articular, es poco probable encontrar una reparación natural del mismo. Por otro lado, se ha demostrado que la evolución de dicha patología no es siempre satisfactoria tras una discectomía y los resultados encontrados son mejores en los casos en los que se realiza una reparación discal en vez de una discectomía (Dolwick; 1983), (Dolwick; 2001). Por este motivo, la búsqueda de nuevas terapias alternativas que promuevan el mecanismo natural de reparación del disco articular constituirían un gran avance a nivel terapéutico.

Hasta la introducción de la Ingeniería Tisular dentro del manejo de la disfunción articular, nunca antes había existido una opción de reemplazar la zona discal dañada por disco nativo equivalente. La Ingeniería Tisular ofrece esta potencial solución de reemplazar el disco degenerado de manera irreversible y eliminar la necesidad de tener que realizar una discectomía. De esta manera, la elaboración de constructos de discos articulares por Ingeniería Tisular constituye un objetivo básico de la Ingeniería Tisular en esta área.

Por todo ello, la Ingeniería Tisular del disco articular de la ATM es una opción a tener en cuenta en el manejo de las disfunciones articulares, ya que podría condicionar de manera muy satisfactoria el pronóstico de estos pacientes.

A continuación, presentamos una breve reseña de los principales estudios de Ingeniería Tisular realizados en el campo de la ATM. Estos estudios están dirigidos a la identificación de los biomateriales adecuados, los factores de crecimiento involucrados en Ingeniería Tisular del disco articular de la ATM y, recientemente, en los biorreactores y fuentes celulares.

El primer intento de Ingeniería Tisular del disco articular de la ATM fue desarrollado por Mills *et al.* (Mills *et al.*; 1988), quien cultivó células de discos articulares de conejos y primates. En estos estudios, los discos se cortaron en láminas de 0.5-mm aproximadamente, fueron lavados en medio de cultivo α (MEM) con 10% de suero fetal bovino (FCS) y antibióticos y, posteriormente, colocados en placas de Petri que contenían geles de colágeno vitrogen con MEM y FCS. En el estudio, las células fueron sometidas a un tratamiento con colagenasa y cultivadas en monocapa con α -MEM, 10 % FCS y antibióticos en una densidad celular de 2×10^4 células/cm². Por otra parte, en el estudio con primates el procedimiento fue similar, variando la densidad celular a 2×10^5 células/cm². Los resultados de este trabajo demostraron la efectividad de las técnicas de cultivo mediante explante de tejido con respecto a la técnica convencional de digestión enzimática con colagenasa en tejidos de origen animal.

Más tarde, Thomas *et al.* (Thomas *et al.*; 1991) cultivó células provenientes de discos articulares de conejos en mallas de colágeno tipo I en medio de cultivo enriquecido con L-glutamina. Para este fin, se utilizaron células correspondientes al segundo subcultivo, las cuales fueron resuspendidas en colágeno tipo I no polimerizado y, posteriormente, cultivadas en una matriz de colágeno poroso, la cual era capaz de inducir la polimerización. Los cultivos celulares establecidos como control se mantuvieron en monocapa y se realizaron ensayos microscópicos, histoquímicos y de conteo celular a los 3, 7 y 14 días. Los resultados de este trabajo demostraron que los sustitutos de disco articular redujeron su diámetro de 16 a 12 mm después de 14 días en cultivo. Las células inmersas en el constructo presentaron una morfología similar a la de los condrocitos, e incrementaron su número en un 10%, siendo positivas para proteoglicanos. Por otra parte, las células control mantuvieron morfología fibroblástica e incrementaron su número en un 225%, siendo positivas para proteoglicanos solo en estados de extrema confluencia. Los resultados de este experimento demostraron la capacidad de diferenciación de las células del disco de la ATM y su inminente utilidad para posibles usos en Ingeniería Tisular.

Posteriormente, en 1994, Puelacher *et al.* (Puelacher *et al.*; 1994) utilizó cartílago hialino para el restablecimiento del disco de la ATM. Dicho estudio se basó en el acondicionamiento de este cartílago dentro de una nueva estructura anatómica. Otros estudios desarrollaron cultivos primarios de condrocitos procedentes de hombros de terneros cultivados en matrices de PLA/PGA durante una semana *in vitro*, utilizando medio de cultivo enriquecido con ácido ascórbico (50 μ g/ml). Posteriormente, estos constructos fueron implantados subcutáneamente en ratones atímicos de 12 semanas.

Los resultados de este trabajo demostraron la presencia de GAG sulfatados y colágeno tipo II, además de demostrar la posibilidad de crear en el laboratorio disco articular utilizando una matriz tridimensional.

En 1994, Guerne *et al.* (Guerne *et al.*; 1994) describió los efectos de diferentes factores de crecimiento como: factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), interleucina-1 (IL-1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento insulínico (IGF) sobre fibroblastos, condrocitos diferenciados y condrocitos desdiferenciados. Sus resultados cualitativos demostraron que los condrocitos desdiferenciados y los fibroblastos recibían una respuesta inductora similar destacando el TGF- β como el inductor más potente para la proliferación de condrocitos, mientras que para los fibroblastos lo fue el PDGF, produciendo el TGF- β únicamente un ligero aumento. Otras de las conclusiones de este trabajo determinaron que eliminando el efecto del PDGF se produce un mínimo descenso en la proliferación de los condrocitos, pero prácticamente anula el efecto del TGF- β en fibroblastos. De esta manera, Guerne *et al.* (Guerne *et al.*; 1994) concluyó que el TGF- β y la IL-1 eran dependientes del PDGF en fibroblastos y que la IL-1 posee efectos opuestos en condrocitos y fibroblastos, inhibiendo la proliferación de condrocitos pero sobreestimulando la proliferación de fibroblastos. Por otra parte, la proliferación de condrocitos y fibroblastos fue estimulada por bFGF en un menor grado que el determinado por PDGF. Sin embargo, bFGF fue más potente que el TGF- β en fibroblastos. Finalmente, IGF-I, que principalmente regula la proliferación y producción de glucosaminoglucanos (GAG) en condrocitos, indujo una respuesta similar en fibroblastos y condrocitos. En resumen, PDGF fue el inductor más potente en la proliferación de fibroblastos, seguido por el bFGF, y el TGF- β se consideró como el inductor más potente en la proliferación de condrocitos. Por lo tanto, es posible que la combinación de factores de crecimiento como PDGF y TGF- β (e, incluso, de bFGF) sean los inductores más efectivos para estudios *in vitro* con células de disco articular de la ATM.

Landesberg *et al.* (Landesberg *et al.*; 1996) descubrió que el TGF- β estimulaba la proliferación celular del disco articular de origen bovino en un 250% en cultivo en monocapa. En una revisión llevada a cabo por Ali y Sharawy (Ali y Sharawy; 1996), se determinó que el TGF- β mejoraba la producción de elastina, la síntesis y agregación de GAG, la formación de núcleos proteicos y disminución del catabolismo de GAG en el cartílago hialino. En un estudio posterior, Landesberg *et al.* (Landesberg *et al.*; 1999) encontró que el PDGF, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el bFGF eran

potentes reguladores de Ekr1/Ekr2 y p38, los cuales se encuentran involucrados (a través de la cadena STAT) en la mayoría de las respuestas celulares de citoquinas activando los factores de transcripción. Ni PDGF, TNF- α ni bFGF regulan STAT.

En 1998, Girdler (Girdler; 1998) logró cultivar células de cartílago condilar. De acuerdo con Milam *et al.* (Milam *et al.*; 1991), el cartílago condilar se divide en 4 zonas diferentes: la capa fibrosa, la zona precondroblástica, la zona cartilaginosa y la zona de mineralización. En sus estudios, Girdler utilizó células de la zona precondroblástica sin detallar las técnicas de aislamiento y caracterización de la población celular de dicha zona. Diversas discusiones afirman que las células utilizadas en este estudio correspondían a una población heterogénea de células del fibrocartílago y cartílago hialino, las cuales se consideran fuentes celulares no aptas para la remodelación del disco articular de la ATM.

Estudios posteriores se llevaron a cabo utilizando células de cartílago condilar de monos en una densidad celular de 50.000 células/cm² en un medio de cultivo enriquecido con ácido ascórbico y glutamina. Las células del cartílago condilar confluyeron a los 21 días y, posteriormente, fueron mezcladas dentro de una solución de colágeno tipo I no polimerizado y fibrinógeno durante 14 días. Al final de este estudio, se observó una viabilidad del 64%, y las células presentaron una morfología poligonal. Por otra parte, los ensayos bioquímicos demostraron la presencia de colágeno tipo I, II y gran cantidad de proteoglicanos determinados cuantitativamente. El periodo de tiempo comprendido entre 3 y 9 días de cultivo demostró que 2/3 de la cantidad total de colágeno correspondía a colágeno tipo I y la cantidad restante correspondía a colágeno tipo II. Sin embargo, a los 21 días en cultivo el 80% correspondía a colágeno tipo II.

En 2001, un estudio realizado por Springer *et al.* (Springer *et al.*; 2001), describió el desarrollo de disco articular de la ATM mediante técnicas de Ingeniería Tisular. En este trabajo, se cultivaron condrocitos humanos y de cerdo provenientes del disco y de la eminencia articular en matrices fabricadas a base de monofilamentos de politetrafluoretileno (ePTFE), monofilamentos de ácido poliglicólico (PGA), monofilamentos de poliamida, bloques de hueso natural y vidrio durante 2, 4 y 8 semanas. Posteriormente, los constructos fueron analizados mediante microscopía electrónica y electroforesis para examinar la presencia de colágeno. Los resultados de este trabajo demostraron que las células cultivadas en bloques de hueso natural generaron protrusiones celulares mayores que aquellas células cultivadas en matrices tridimensionales sintéticas. Además, determinaron que el proceso de adhesión fue

similar para todos los grupos y no se encontraron diferencias entre células de origen animal y las células de origen humano. El patrón de crecimiento, la estructura celular, agregación y proliferación fue independiente del material utilizado como matriz. Por otra parte, la mayoría de las células presentaron una morfología similar a los condrocitos con ausencia de células fusiformes. El análisis a las cuatro semanas demostró la presencia de múltiples capas celulares dentro de las matrices de poliamida, ePTFE y PGA. Finalmente, las matrices de PGLA mostraron pequeñas zonas de quiebre a las cuatro semanas con inestabilidad completa a las 8 semanas. Teniendo en cuenta estos estudios, Springer *et al.* (Springer *et al.*; 2001) afirmó que las matrices artificiales para la reparación del disco articular requieren estabilidad por un periodo de 6 a 12 semanas.

Se han realizado pocos estudios en los cuales se caracterice una matriz para la regeneración del disco de la ATM. Sin embargo, Poshusta y Anseth (Poshusta y Anseth; 2001) sugirieron el uso de materiales fotopolimerizables debido a su tiempo de reacción rápido y por su control espacial en el proceso de polimerización como grandes ventajas a la hora de realizar procesos de regeneración.

Otros estudios realizados por Almarza y Athanasiou (Almarza y Athanasiou; 2004) compararon el potencial de un hidrogel y de un biomaterial poroso en el mismo estudio, concluyendo que la utilización de mallas porosas tiene mayores ventajas en comparación con los hidrogeles cuando se trabaja en poblaciones celulares del disco articular de la ATM.

Recientemente se han publicado estudios de investigación sobre los factores de crecimiento utilizados en Ingeniería Tisular de células de disco articular de la ATM del cerdo: Detamore y Athanasiou (Detamore y Athanasiou; 2004), Detamore y Athanasiou (Detamore y Athanasiou; 2005) y Almarza y Athanasiou (Almarza y Athanasiou; 2006). En estos estudios se determinó el papel de diversos factores de crecimiento: PDGF, IGF, bFGF y TGF- β . Aunque las diferencias encontradas no fueron muy significativas, se observó que el IGF y TGF- β estaban más relacionados con la síntesis de colágeno y PDGF y bFGF con el aumento en la producción de GAG. Concluyendo así que los constructos sometidos a factores de crecimiento presentaron una mayor celularidad e integridad estructural y mecánica.

Así mismo, Almarza y Athanasiou (Almarza y Athanasiou; 2005) y Bean *et al.* (Beal *et al.*; 2006) observaron que, cultivando una concentración elevada de células de disco

articular del cerdo con ácido ascórbico (25 µg/ml) en constructos de PGA, se obtenían mejores resultados que con otras técnicas.

Existen dos estudios publicados sobre el uso de estímulos mecánicos en Ingeniería Tisular del disco articular de la ATM. El primero fue realizado por Detamore y Athanasiou (Detamore y Athanasiou; 2005), quienes utilizaron un biomaterial de PGA en un biorreactor rotatorio, obteniendo constructos de menor tamaño y matriz más densa. Con este estudio se llegó a la conclusión que los cultivos en biorreactores rotatorios no son adecuados para la Ingeniería Tisular del disco articular de la ATM.

El segundo estudio fue realizado por Almarza y Athanasiou (Almarza y Athanasiou; 2006) quienes observaron el efecto de la presión hidrostática aplicada de manera intermitente y constante en las células del disco articular de la ATM cultivadas en monocapas. El resultado obtenido fue que una estimulación constante incrementaba la producción de colágeno en los constructos.

Hasta el momento se han realizado estudios de investigación de las células del disco articular de la ATM (Thomas *et al.*; 1991), (Springer *et al.*; 2001), (Johns y Athanasiou; 2007), (Allen y Athanasiou; 2007) y condrocitos articulares (Puelacher *et al.*; 1994), (Girdler; 1998), (Springer *et al.*; 2001) como posibles fuentes celulares en Ingeniería Tisular del disco de la ATM. El uso de células de cartílago articular autólogas asocia una morbilidad del sitio donante, por lo que ha surgido la necesidad de introducir nuevas fuentes celulares para el desarrollo de la Ingeniería Tisular del disco de la ATM. Estas nuevas fuentes celulares ocupan parte de las investigaciones de los últimos años. Dentro de éstas se encuentran células madres de tejido adiposo, células madres embrionarias, células madres mesenquimales de médula ósea y fibroblastos dérmicos (Allen y Athanasiou; 2007), (Johns, Wong y Athanasiou; 2008), (Mäenpää *et al.*; 2010), (Su y Kang; 2010).

Los últimos estudios realizados se centran en los factores de crecimiento relacionados con la Ingeniería Tisular del disco articular (Kalpakci, Kim y Athanasiou; 2011), (Kang *et al.*; 2011).

2.3. VIABILIDAD CELULAR

El objetivo principal de la Ingeniería Tisular es regenerar y restablecer la función normal de un órgano o tejido dañado a través de la utilización de células que han sido cultivadas en el laboratorio o en matrices artificiales, para que posteriormente puedan ser trasplantadas a un órgano receptor. De esta forma, uno de los requisitos más importantes a destacar, antes de que las células puedan ser implantadas, es la determinación de la viabilidad de las células mantenidas en cultivo.

Existen una serie de métodos y técnicas de laboratorio útiles para la evaluación de la viabilidad y de la funcionalidad celular (Tabla 1). Destacan entre ellos la evaluación de la integridad de la membrana celular, los ensayos funcionales, los ensayos con pruebas de fluorescencia, los estudios de morfología celular, el microanálisis por energía dispersiva de rayos X y las técnicas de determinación de la expresión génica mediante *microarray*.

Tabla 1. Resumen de los ensayos de evaluación de viabilidad celular más importantes

Ensayos de evaluación de la viabilidad celular	Métodos de evaluación de la viabilidad celular	Fundamento
Evaluación de la integridad de la membrana	<ol style="list-style-type: none"> 1. Métodos basados en la exclusión o inclusión de colorantes o sustancias fluorescentes 2. Métodos basados en la utilización de tinciones catiónicas 3. Métodos basados en la determinación de liberación de moléculas 	Si una célula está dañada, la función de la membrana celular estará alterada. A su través pasarán moléculas o no, que en condiciones normales no lo harían
Ensayos funcionales	<ol style="list-style-type: none"> 1. Medición del ATP 2. Tasa de ADN 3. Síntesis de proteínas 	Evalúan los componentes metabólicos que son necesarios para el crecimiento celular
Ensayos con pruebas de fluorescencia	Utilización de Biosensores de Fluorescencia	Miden la dinámica molecular de macromoléculas, metabolitos e iones en células vivas
Ensayos morfológicos	Métodos basados en la observación con el microscopio	Determinación del cambio morfológico
Microscopía electrónica analítica	Microanálisis por energía dispersiva de rayos X	Determinan la composición elemental de una muestra en el microscopio electrónico
Determinación de la expresión génica global	<i>Microarray</i> de ADNc <i>Microarray</i> de oligonucleótidos	Evaluación de la expresión de genes de un genoma completo

2.3.1. Evaluación de la integridad de la membrana celular

Probablemente los métodos de detección de alteraciones de la permeabilidad de la membrana sean los métodos de evaluación de la viabilidad celular más numerosos y utilizados, pudiendo distinguirse dentro de éstos dos variantes:

- Métodos basados en la exclusión o inclusión de colorantes vitales o sustancias con propiedades de fluorescencia.
- Métodos basados en la determinación de la liberación de moléculas, fundamentalmente enzimas o ácidos nucleicos, en el medio extracelular.

Los métodos basados en el empleo de colorantes vitales suelen consistir en la utilización de un colorante que, en función de sus características, es capaz de penetrar y colorear el interior celular, bien de las células vivas o bien de las células muertas. La proporción relativa de las células coloreadas o no coloreadas, refleja el número exacto de las células vivas o muertas y, en consecuencia, la viabilidad del conjunto de la población celular. El conteo de las diferentes poblaciones celulares puede ser efectuado por métodos microscópicos, citometría de flujo, espectrofotometría o espectrofluometría automatizada. Con frecuencia, se han utilizado colorantes orgánicos como el azul tripán (Hoskins *et al.*; 1956), (Phillips; 1973), (Patterson; 1979), la eosina (Hoskins *et al.*; 1956), el rojo Congo (Geschickter; 1930), la eritrosina B (Phillips *et al.*; 1957), (Bhuyan *et al.*; 1976), siendo el azul tripán el colorante que más se ha utilizado hasta el momento. Con la técnica de viabilidad del azul tripán, si la membrana plasmática está dañada, la célula se tiñe de púrpura-violeta, mientras que las células no dañadas aparecen translúcidas al microscopio.

Por otra parte, ensayos de viabilidad biofuncional basados en sustancias fluorescentes como el Live/Dead[®] permiten cuantificar la viabilidad celular de los condrocitos en base a la integridad de su membrana plasmática, al igual que el método de exclusión con azul tripán, y en base a su funcionalidad. En este caso se emplean dos sustancias fluorescentes: *acetometoxi-calceína* y *compuesto de etidio*. La acetometoxi-calceína nos permite realizar un ensayo funcional, pues será permeable a la membrana plasmática de células viables. En el citosol de las células vivas, la acetometoxi-calceína es hidrolizada por acción esterasa, dando lugar a la calceína, una sustancia que emite una señal fluorescente en el espectro del color verde (494-517 nm). El compuesto de etidio, por otra parte, no penetrará en aquellas células viables, haciéndolo sólo en caso de que la célula tenga una membrana alterada (método de exclusión). Cuando el compuesto de etidio alcanza el núcleo celular, se une a la

molécula de ADN, aumentando así su fluorescencia hasta 40 veces y emitiendo una señal en el espectro del rojo (517-617 nm).

Por otro lado, tenemos los métodos basados en la detección y medición de determinadas moléculas intracelulares liberadas al medio de cultivo. Éstos están fundamentados en las alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular bajo la acción de determinados tóxicos o bien por el envejecimiento celular espontáneo. Dichos métodos comprenden dos tipos de ensayos, uno enzimático y otro radiactivo, siendo los primeros los más utilizados. Uno de los ensayos enzimáticos más comunes es la determinación del enzima citosólico *lactato deshidrogenasa* (LDH) en el medio de cultivo, enzima que es liberada al medio extracelular únicamente cuando la membrana plasmática ha sido gravemente alterada. Otras moléculas de interés a la hora de evaluar la viabilidad celular son las enzimas mitocondriales o incluso el ADN nuclear. La detección de niveles elevados de cualquiera de estas moléculas en el medio de cultivo son claros indicativos de que un porcentaje significativo de células ha sido destruido y, por tanto, de que la viabilidad celular es baja (Coco-Martin *et al.*; 1992), (Da Costa *et al.*; 1999), (Posadas *et al.*; 2007), (Ikegami *et al.*; 2007), (Park *et al.*; 2008).

Cabe destacar, dentro de los métodos más utilizados, aquel que determina la viabilidad celular mediante la prueba del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este compuesto, de color amarillento, es capaz de reducirse y adquirir color morado por acción de las enzimas intramitocondriales de las células vivas. Por esta razón, la adición de MTT al medio de cultivo y la posterior cuantificación colorimétrica del producto nos puede dar una idea bastante fiable del número de células vivas y muertas que existen en el cultivo celular (Brink *et al.*; 2008).

Por último, tenemos que mencionar aquellos que se basan en la radioactividad cuyo fundamento científico es la medición de la liberación del Cr51, isótopo radiactivo que se une de manera no covalente a los aminoácidos básicos de las proteínas intracelulares. Las células inertes liberan el Cr51 en el medio extracelular, el cual puede ser cuantificado por un contador gamma (Rinaldi *et al.*; 1998).

2.3.2. Ensayos funcionales

Este tipo de métodos aplicados a la determinación de la viabilidad celular tratan de evaluar los componentes metabólicos que son necesarios para el crecimiento celular, bajo la premisa de que el daño celular produciría una pérdida en la habilidad para mantener y producir la energía necesaria para el correcto funcionamiento metabólico y

para el crecimiento. Dentro de los ensayos funcionales, encontramos aquellos que pueden medir los niveles de trifosfato de adenosina (ATP), la tasa de ADN y la síntesis de proteínas.

2.3.3. Ensayos con pruebas de fluorescencia

Los biosensores de fluorescencia permiten medir la dinámica molecular de macromoléculas, metabolitos e iones en células vivas con una enorme resolución temporal y espacial. Los biosensores son proteínas marcadas con fluorescencia que miden reacciones químicas específicas, las cuales pueden ocurrir tanto dentro de la célula como en su superficie. Cuando el biosensor se encuentra dentro de una célula viva, el componente proteico del biosensor se activa y la molécula fluorescente unida a este componente proteico traduce los cambios ambientales en señales fluorescentes en la proximidad del lugar.

Con este tipo de técnicas se puede conocer la viabilidad celular de manera rápida.

2.3.4. Ensayos morfológicos

Estos métodos de evaluación de la viabilidad celular se fundamentan en la observación mediante el microscopio. Los cambios morfológicos que se producen en la superficie celular o en el citoesqueleto pueden estar relacionados con la viabilidad celular (Emilson *et al.*; 1978), (Wiesel *et al.*; 1983), (Beattie *et al.*; 1994), (Amato y Lozzi; 1981), (Debbage; 1985). De esta forma, los cambios de volumen irreversibles pueden ser utilizados para indicar la muerte celular. Cuando se produce una gran disminución en el volumen celular, éste puede ser secundario a la pérdida de proteínas o iones intracelulares, o debido a una alteración de la permeabilidad para el sodio o el potasio (Allen; 1988).

La realización de esta técnica es más complicada, por lo que su utilidad es menor que la evaluación de la integridad de la membrana o los ensayos funcionales.

2.3.5. Microscopía electrónica analítica

El microanálisis por energía dispersiva de rayos X o microscopía electrónica analítica es una técnica que permite determinar la composición elemental de una muestra al microscopio electrónico (Warley; 1997), permitiendo así correlacionar la información sobre la ultraestructura de la célula con su contenido elemental y, además, permite el análisis simultáneo de todos los cationes y aniones con número atómico inferior o igual a 11 ($Z \leq 11$) (Warley *et al.*; 1994), (Rodríguez-Morata *et al.*; 2008).

La cuantificación de la composición iónica celular, especialmente del potasio y del sodio, es considerada una de las técnicas más sensibles para la determinación de la viabilidad de las células en cultivo (Rodríguez-Morata *et al.*; 2008). La concentración intracelular de estos iones se correlaciona bastante bien con el estado vital celular y es un excelente marcador de la fisiología y de la viabilidad celular (Roomans; 1996), (Zierold; 1997), (Fernández-Segura *et al.*; 1999). El microanálisis por energía dispersiva de rayos X asociado a la microscopía electrónica supone una potente herramienta para cuantificar los elementos de una muestra, al mismo tiempo que se consigue determinar la concentración de los mismos y la ultraestructura de las células (Buja *et al.*; 1985), (Hall; 1988), (Warley; 1997), (Vanthanouvong *et al.*; 2003). Es una técnica que, mediante la utilización de un haz de electrones, permite estudiar la composición química de la muestra de forma simultánea a su observación microscópica (Carini *et al.*; 1995), (Carini *et al.*; 1997), (Carini *et al.*; 2000).

La microscopía electrónica analítica permite, a su vez, la cuantificación de los elementos objeto de estudio, lo cual exige el desarrollo de protocolos específicos (Campos *et al.*; 1992), (Crespo *et al.*; 1993), (López-Escámez *et al.*; 1992 y 1993), (Campos *et al.*; 1994), (López-Escámez y Campos; 1994), (Warley *et al.*; 1994), (Warley; 1997), (Fernández-Segura *et al.*; 1999a y 1999b), (Sánchez-Quevedo *et al.*; 2006), (Alaminos *et al.*; 2007), (Sánchez-Quevedo *et al.*; 2007), (Rojas-Sánchez *et al.*; 2007), (Alaminos *et al.*; 2008), (Rodríguez-Morata *et al.*; 2008), (Rodríguez *et al.*; 2011).

Cada célula analizada posee un determinado perfil iónico (Figura 22). En los espectros obtenidos del perfil iónico se pueden observar elementos como el fósforo (P), azufre (S), magnesio (Mg), cloro (Cl), calcio (Ca), sodio (Na) y potasio (K). Algunos de los iones determinados por microanálisis juegan un papel en la viabilidad celular, de tal manera que cambios en la concentración de estos iones en una célula pueden correlacionarse con procesos de muerte celular por necrosis o apoptosis (Tabla 2) (Hongpaisan y Roomans; 1999), (Roomans; 1999), (Roomans; 2002). En este contexto, algunos autores han identificado patrones iónicos específicos para las células normales, células en apoptosis y células en necrosis.

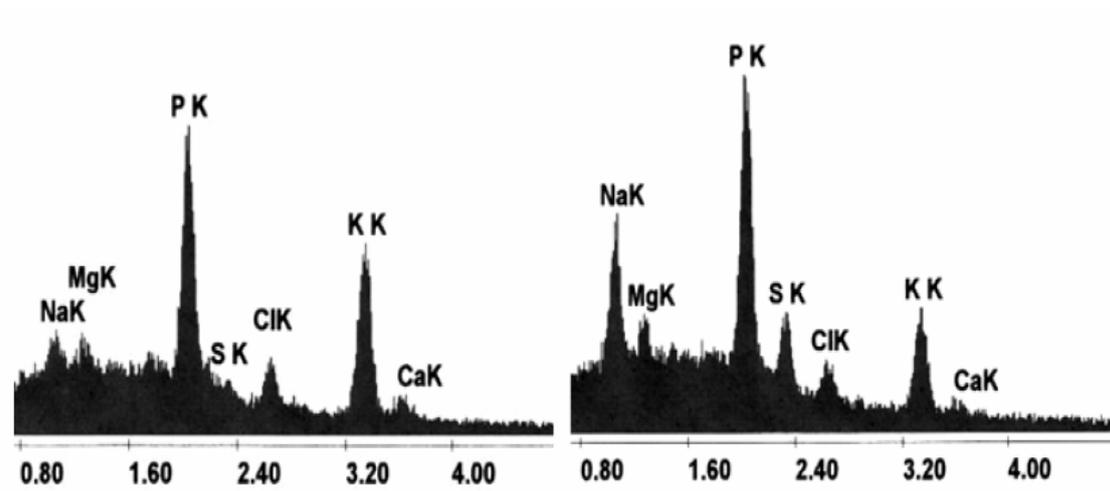


Figura 22. Se muestran dos espectros microanalíticos correspondientes a células del tercer subcultivo del endotelio corneal de un conejo. Cada uno de los picos corresponde a la emisión de energía dispersiva por electrones localizados en los orbitales *K* del sodio (NaK), magnesio (MgK), fósforo (PK), azufre (SK), cloro (ClK), potasio (KK) y calcio (CaK) (Alaminos *et al.*; 2007b).

Tabla 2. Perfil iónico de los elementos observados en el microanálisis por energía dispersiva de rayos X	
Fósforo (P)	Cuando la célula presenta un daño estructural, disminuye su concentración en el espectro analítico
Azufre (S)	Constituye un indicador microanalítico del contenido de proteínas sulfuradas, glucosaminoglucanos y proteoglucanos
Magnesio (Mg)	Un descenso en la concentración elemental de magnesio se correlaciona con un descenso en la concentración de ATP celular
Cloro (Cl)	El descenso de cloro es un indicador precoz de apoptosis
Calcio (Ca)	Se incrementa significativamente en algunos tipos de muerte celular
Razón <i>Potasio/Sodio</i>	Indicador de viabilidad celular

2.3.6. Determinación del perfil de expresión génica mediante *microarray*

El *microarray* se podría definir como una técnica que permite la evaluación simultánea de un gran número de genes o, incluso, de un genoma completo, en un único experimento (Friemert *et al.*; 1989), (Gress *et al.*; 1992). Recientemente, esta técnica se ha convertido en una herramienta fundamental para el estudio de determinadas propiedades específicas de las células susceptibles de utilización en Terapia Celular y en Ingeniería Tisular (Schena *et al.*; 1995), (Gill; 2003), (Jaluria *et al.*; 2007 y 2008). Por ejemplo, una de las propiedades celulares que se puede evaluar con el *microarray* podría ser la viabilidad celular mediante la identificación de genes relacionados con la mortalidad celular (por ejemplo, genes de apoptosis y anti-apoptosis) (Wong *et al.*; 2006) y, de esta manera, se podría realizar una selección de las células, escogiendo las que tienen un mayor grado de viabilidad.

Atendiendo a su función, podemos distinguir tres tipos fundamentales de *microarray*:

1.- *Microarray* de expresión génica (Bowtell; 1999). Este tipo de *microarray* son los más utilizados y mejor conocidos. Esta técnica se basa fundamentalmente en la detección de ARN mensajeros específicos que están presentes en una muestra biológica en un momento determinado. Para ello, se extrae el ARN total de dicha muestra, el cual se marca con un pigmento y se hibrida frente a un *chip* o matriz en la que existen copias de ADN complementario (ADNc) a los genes que se pretenden cuantificar.

2.- *Microarray* de ADN (Bier *et al.*; 2008), (Wiltgen y Titz; 2007). En este tipo, el ADN total procedente de una muestra se marca y se hibrida frente a un *chip* en el que existen copias de los genes a identificar. De este modo, se puede evaluar el número de copias de cada gen existente en cada célula, así como la presencia de deleciones, mutaciones o ganancias génicas. Por esta razón, este tipo de *microarray* permite realizar un análisis completo del genoma de la célula (genotipificación). Un tipo especial de *microarray* de ADN es aquél en el que se evalúa la presencia de modificaciones epigenéticas tipo metilación a nivel del promotor de ciertos genes (Zilberman y Henikoff; 2007).

3.- *Microarray* de proteínas (Tao *et al.*; 2007). Este tipo de *microarray* consiste en un *chip* en el que se coloca cierto número de anticuerpos específicos de origen conocido, frente al cual se hibrida un extracto proteico previamente marcado.

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Establecer cultivos primarios de condrocitos fibrosos humanos a partir de muestras del disco articular de la articulación temporomandibular humana (ATM).
2. Evaluar la viabilidad de los condrocitos fibrosos del disco articular de la ATM durante los 9 primeros pases celulares utilizando técnicas mixtas (Live/Dead®).
3. Evaluar la viabilidad de los condrocitos fibrosos del disco articular de la ATM durante los 9 primeros pases celulares utilizando técnicas de exclusión de colorantes vitales (azul tripán).
4. Evaluar la viabilidad de los condrocitos fibrosos del disco articular de la ATM durante los 9 primeros pases celulares mediante la determinación del perfil iónico cuantitativo mediante microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X.
5. Determinar la viabilidad de los condrocitos fibrosos del disco articular de la ATM durante los 9 primeros pases celulares mediante el cálculo de la Viabilidad Media.
6. Evaluar la viabilidad de los condrocitos fibrosos del disco articular de la ATM durante los 9 primeros pases celulares mediante la determinación del perfil de expresión génica global utilizando *microarray* de ARN.

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AISLAMIENTO DE CONDROCITOS

Para la realización de este trabajo, hemos utilizado condrocitos articulares humanos obtenidos a partir de diferentes biopsias de disco articular de la articulación temporomandibular de adulto humano. Dichas biopsias se llevaron a cabo en el transcurso de intervenciones quirúrgicas consistentes en la extirpación del disco articular en pacientes que presentaban un estadio avanzado del Síndrome de Disfunción Temporomandibular con degeneración avanzada del disco. Los pacientes fueron escogidos al azar entre aquellos que figuraban en la lista de espera quirúrgica para someterse a dicha intervención, dentro del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del H. U. Virgen de las Nieves (Granada), tras la obtención del consentimiento informado. De los distintos discos articulares, se aislaron las biopsias que fueron conservadas en medio de transporte a 4°C, donde se mantuvieron hasta el momento de su procesamiento. Este medio de transporte consistió en un medio básico DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma-Aldrich ref. D5796, St. Louis, Missouri, EEUU; ver composición en Tabla) suplementados con antibióticos y antimitóticos (500 U/ml de anfotericina B, Sigma-Aldrich ref. A5955) pero sin suero bovino fetal. Con el objetivo de conseguir disgregar la matriz extracelular del cartílago y conseguir la separación de los condrocitos de dicha matriz, las muestras se incubaron en una disolución de colagenasa II de *Clostridium histolyticum* (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) al 2% a 37°C durante 6 horas. Esta solución es capaz de digerir el colágeno y la matriz extracelular y liberar los condrocitos existentes en el cartílago. Las muestras digeridas en colagenasa se centrifugaron a 1000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, con el fin de obtener las células disgregadas de la matriz extracelular, recogiendo el *pellet* celular correspondiente. Posteriormente, este *pellet* celular se cultivó en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie tipo Falcon® con medio de cultivo QC. El medio QC fue descrito por De Diego (De Diego *et al.*; 2004) y Llamas (Llamas *et al.*; 2004) para el cultivo de queratinocitos de la piel, habiendo demostrado su utilidad en el cultivo de diversos tipos de células humanas y animales (Alaminos *et al.*; 2006 y 2007), (Sánchez Quevedo *et al.*; 2007). La composición de este medio de cultivo es la siguiente:

- Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM): 300 ml (Sigma-Aldrich Ref. D5796).
- Medio HAM-F12: 150 ml (Sigma-Aldrich Ref. N6658).
- Adenina: 24 µg/ml (Sigma-Aldrich Ref. A9795).
- Hidrocortisona: 0, 4 mg/ml (Sigma-Aldrich Ref. H0888).

- Insulina: 5 mg/ml (Sigma-Aldrich Ref. I2767).
- Triyodotironina: 1, 3 ng/ml (Sigma-Aldrich Ref. T5516).
- Suero bovino fetal (SBF): 50 ml (Sigma-Aldrich Ref. F9665).
- Antibióticos y antimicóticos: 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B (Sigma-Aldrich Ref. A5955).

Todos los cultivos celulares se incubaron a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo. Los medios de cultivo se renovaron cada tres días.

2. OBTENCIÓN DE SUBCULTIVOS CELULARES

Cada vez que los condrocitos articulares humanos, en su disposición de monocapa alcanzaron la semiconfluencia, las células se lavaron con 5 ml de PBS (tampón fosfato, Sigma-Aldrich ref. P4417) para eliminar cualquier resto del medio de cultivo y las células muertas. A continuación, se cubrió toda la superficie de cultivo con aproximadamente 2 ml de solución de disociación celular (Sigma-Aldrich ref. C5789) para disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo, incubándose cinco minutos a 37 °C.

Pasado este tiempo, y una vez quedó comprobada la separación de las células del frasco, se añadieron 5 ml de medio QC para inactivar el efecto de la solución de disociación, recogiendo ambos en un tubo cónico que se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. El precipitado o *pellet* celular que se obtuvo se resuspendió en medio de cultivo QC y se sembró en nuevos frascos de cultivo con medio QC. Este procedimiento se llevó a cabo un total de ocho veces, obteniéndose así un total de 9 pases (un primocultivo y 8 subcultivos).

3. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE TÉCNICAS MIXTAS METABÓLICAS Y DE EXCLUSIÓN DE COLORANTES VITALES (LIVE/DEAD®)

La determinación de la viabilidad celular de condrocitos humanos procedentes de biopsias de disco articular de la ATM adulta se realizó, en primer lugar, mediante la técnica *Live/Dead*®. Para la realización de esta técnica se cultivaron 2×10^5 células durante 48 horas en cada uno de los 4 pocillos de una placa tipo Chambers (Lab-Tek

II, Nunc, Rochester, NY, USA). Tras 48 horas, el medio fue eliminado de los pocillos y las células fueron lavadas con PBS para eliminar el suero bovino fetal, con actividad esterasa. Se utilizaron los fluorocromos del kit comercial LIVE/DEAD® *Viability/citotoxicity kit for mammalian cells* (Invitrogen, Oregon, USA) diluidos en PBS. Se añadió a cada pocillo 500 µl de solución con fluorocromos y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Inmediatamente después se procedió a la toma de imágenes con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-U (Nikon Instruments Inc, NY, USA). Las longitudes de onda de excitación de los fluorocromos fueron 494 nm para la calceína y 528 nm para bromuro de etidio, respectivamente. Posteriormente, los recuentos celulares se efectuaron con ayuda del software ImageJ para su posterior análisis estadístico. Para el cálculo del porcentaje de células vivas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad} = [\text{N}^{\circ} \text{ células vivas} / (\text{N}^{\circ} \text{ células vivas} + \text{N}^{\circ} \text{ células muertas})] \times 100$$

Todo este proceso se llevó a cabo un total de nueve veces, de forma que en cada pase celular se realizó un control de la viabilidad celular con este método.

4. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE TÉCNICAS DE EXCLUSIÓN DE COLORANTES VITALES (AZUL TRIPÁN)

Un segundo ensayo de viabilidad celular basado en la exclusión de colorantes vitales fue realizado mediante el uso de la técnica *azul tripán* y contaje celular en cámara de Neubauer.

Dicha cámara consiste en un sistema de contaje adaptado al microscopio óptico. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado, con la ayuda de un diamante, una cuadrícula de 3 x 3 mm², con una separación entre dos líneas consecutivas de 0,25 mm. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0,1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando la cámara se cubre con un cubreobjetos, éste dista de la superficie marcada 0,1 mm, siendo el volumen comprendido entre la superficie y el cubreobjetos de 0,1 mm³, es decir 0,1 µl (Figura 23). Esto permite hacer un cálculo del número de células existente en un volumen fijo. Dentro de cada cuadrícula existen áreas de contaje de 1 mm². La tinción con azul tripán utiliza un colorante soluble en agua, altamente tóxico, que posee grupos amino y sulfato cargados eléctricamente. La utilidad de este colorante

en biología es muy importante, habiéndose utilizado este método para determinar la viabilidad de distintos tipos de células (Alaminos *et al.*; 2007), (Hu *et al.*; 2007). En general, el azul tripán es capaz de teñir de color azul solamente las células muertas o aquellas en las que la membrana celular ha sido fragmentada. Sin embargo, las células vivas son capaces de excluir activamente este colorante y, por tanto, mantienen su color original translúcido o blanco.

El protocolo de trabajo que se realizó, consistió, en primer lugar, en tripsinizar los cultivos celulares para separar las células del frasco de cultivo, centrifugándose la mezcla para obtener un precipitado o *pellet* celular, el cual se diluyó en una pequeña cantidad de medio de cultivo. A continuación, se tomaron 50 µl de la suspensión celular obtenida, la cual se incubó en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml con un volumen equivalente (50 µl) de solución de azul tripán al 0,4% (Sigma-Aldrich ref. T8154) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomó una muestra de 10-15 µl de la mezcla que se colocó en una cámara de Neubauer (Figura 24), procediéndose al recuento de las células vivas (blancas, birrefringentes) y muertas (azules) utilizando un microscopio óptico Leica Laborlux 12 (Leica, Barcelona, España). Para el cálculo del porcentaje de células vivas se utilizó la misma fórmula utilizada para la técnica Live/Dead®:

$$\text{Viabilidad} = [\text{N}^{\circ} \text{ células vivas} / (\text{N}^{\circ} \text{ células vivas} + \text{N}^{\circ} \text{ células muertas})] \times 100$$

Todo este proceso se llevó a cabo un total de nueve veces, de forma que en cada pase celular se realizó un control de la viabilidad celular con este método.

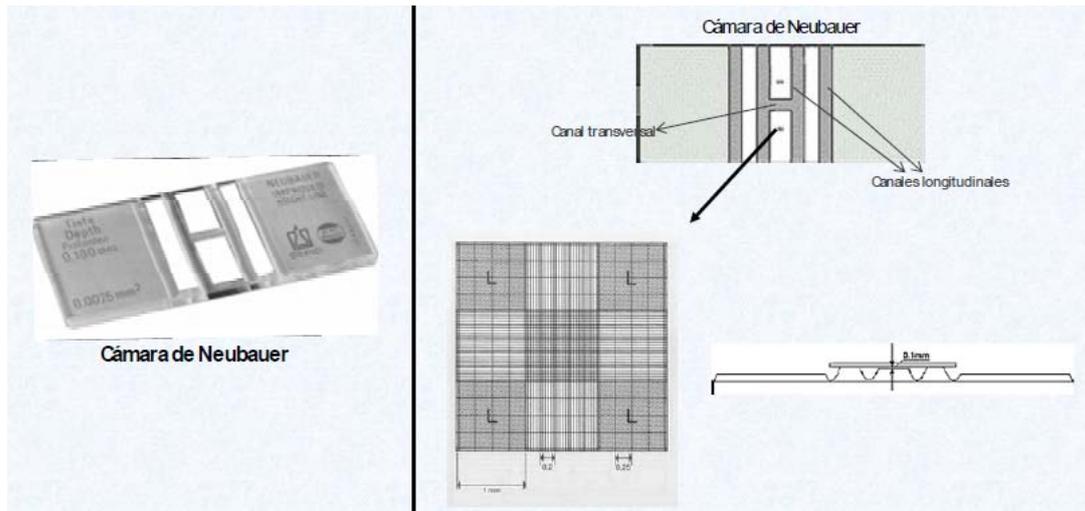


Figura 23. Cámara de Neubauer. En el puente central (fondo de la cámara) están grabadas las redes de conteo. Cuando se coloca un cubreobjetos sobre los puentes exteriores, entre la cara inferior del cubreobjetos y el puente central de la cámara se forma una ranura capilar.

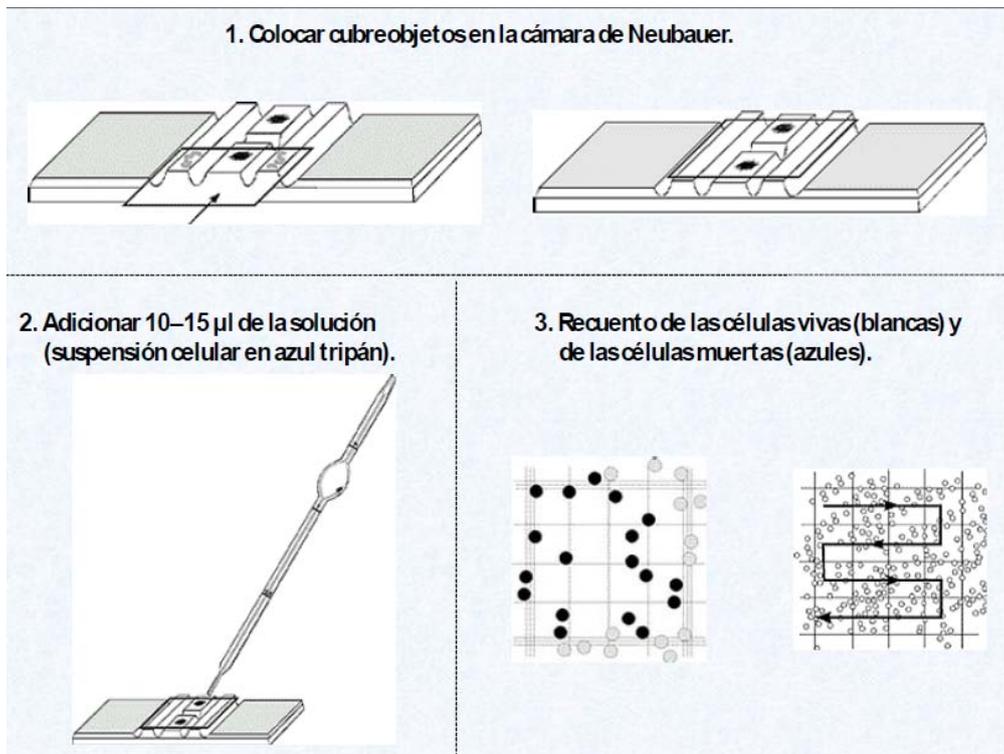


Figura 24. Representación esquemática de la cámara de Neubauer utilizada para el recuento de células viables mediante la técnica de azul tripán.

5. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL PERFIL IÓNICO CUANTITATIVO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA ANALÍTICA POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X

El tercer método utilizado para analizar la viabilidad celular de los condrocitos mantenidos en cultivo fue el *microanálisis por energía dispersiva de rayos X*. La metodología aplicada tiene como base estudios previos realizados en el laboratorio con la finalidad de evaluar la composición en sodio (Na), magnesio (Mg), fósforo (P), cloro (Cl), potasio (K), azufre (S) y calcio (Ca) en células en cultivo de crecimiento en monocapa y en suspensión como las células MCF-7, LLC-PK y U-937, respectivamente (Fernández-Segura *et al.*, 1997a, 1997b; 1999). Este procedimiento se caracteriza básicamente por:

- 1) adaptación de las células sobre soportes adecuados para microanálisis por rayos X;
- 2) eliminación del medio extracelular;
- 3) criofijación;
- 4) criodesecación;
- 5) observación y análisis elemental mediante un microscopio electrónico de barrido equipado de un sistema de energía dispersiva por rayos X, y
- 6) cuantificación de las concentraciones elementales mediante el método de la razón pico fondo (P/B).

Dicho protocolo, representado de forma esquemática en la Figura 25, se llevó a cabo tal como se indica a continuación:

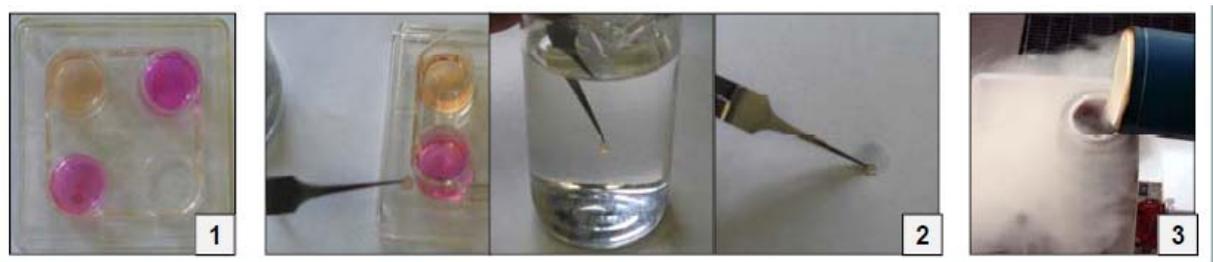


Figura 25. Preparación de condrocitos mantenidos en cultivo para análisis del perfil iónico cuantitativo mediante microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X. Los condrocitos cultivados sobre rejillas de oro cubiertas de pioloformo son lavados en agua destilada, criofijados por inmersión en nitrógeno líquido, desecados en frío y recubiertos con carbón.

1) Adhesión de las células al soporte. Las células mantenidas en cultivo se tripsinizaron y se cultivaron sobre rejillas de oro (Gilder Ref. G100-G3) especiales para microscopía electrónica (Figura 26). En primer lugar, las rejillas se lavaron durante 5 minutos en cloroformo para eliminar cualquier resto de materia orgánica que pudiese haberse depositado sobre las mismas, aclarándose a continuación en etanol absoluto (dos lavados de 5 minutos cada uno). Finalmente, las rejillas se lavaron en ácido acético 2% durante 5 minutos y se aclararon en etanol absoluto durante otros 5 minutos, dejándose secar al aire. Para permitir el crecimiento de las células sobre las rejillas de oro, se aplicó una fina capa de pioloformo sobre las rejillas. El pioloformo (químicamente, *polivinil butiral*) es un polímero soluble en cloroformo y otros disolventes orgánicos muy utilizado para el recubrimiento de superficies porosas para protección o aplicación de otros componentes (Figura 27). Para la preparación de las rejillas de oro, se disolvieron 25 mg de pioloformo en 50 ml de cloroformo, agitándose hasta la completa disolución del mismo. A continuación, se obtuvieron delgadas películas de este polímero orgánico mediante inmersión de portaobjetos de vidrio en la solución de pioloformo que, al secarse, quedaron cubiertos de este producto. Para la separación de las láminas de pioloformo polimerizado, se sumergieron cuidadosamente los portaobjetos impregnados y secados al aire en un baño de agua a temperatura ambiente. La separación de las películas de pioloformo de los portaobjetos se produjo espontáneamente debido al carácter marcadamente hidrofóbico de este compuesto. A continuación, se depositaron las rejillas de oro lavadas sobre las láminas de pioloformo, cubriéndose las primeras con cubreobjetos redondos de 1 cm de diámetro. Finalmente, se colocaron los cubreobjetos con las rejillas y las láminas de pioloformo adheridas a su superficie sobre placas de cultivo celular de 4 pocillos, esterilizándose mediante irradiación ultravioleta durante 6-12 horas. Una vez esterilizadas las rejillas cubiertas por pioloformo, se subcultivaron los condrocitos humanos procedentes de disco articular sobre éstas y se incubaron en medio de cultivo QC durante 24 horas.

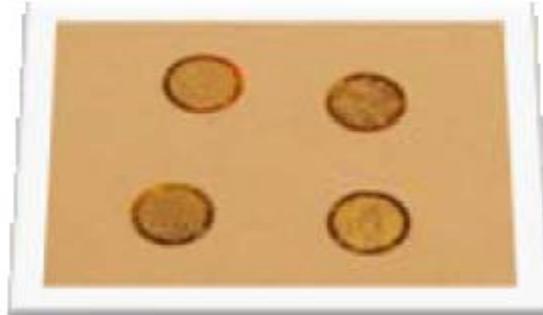


Figura 26. Rejillas de oro sobre las que se depositó una fina capa de pioloformo para permitir la adhesión celular.

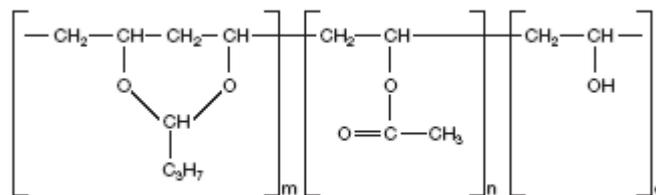


Figura 27. Estructura química del *polivinil butiral* (pioloformo).

2) Eliminación del medio extracelular. Con el objetivo de eliminar la contribución del medio extracelular al espectro de rayos X en los análisis de los condrocitos, se procedió al lavado de las rejillas conteniendo las células de acuerdo con los criterios establecidos previamente por diferentes autores (Wroblewski *et al.*; 1983), (Wroblewski y Roomans; 1984), (Abraham *et al.*; 1985), (Zierold y Schäfer; 1988), (von Euler *et al.*; 1993), (Warley; 1994 a y b), (Fernández-Segura *et al.*; 1997-1), eligiendo como solución lavadora el agua destilada. Las muestras fueron lavadas mediante inmersión en agua destilada a una temperatura de 4°C, durante 5 segundos. La solución lavadora se mantiene en movimiento constante por agitación magnética.

3) Criofijación de las muestras. Las muestras lavadas se criofijaron mediante inmersión rápida de las mismas en nitrógeno líquido. Previamente se eliminó el exceso

de agua con un papel de filtro. Las rejillas con las células criofijadas se introdujeron en un portamuestras de aluminio preenfriado a -196°C mediante inmersión en nitrógeno líquido. El uso de este tipo de portamuestras permite el procesamiento simultáneo de varias muestras.

4) Criodesecación de las muestras. Las células criofijadas y en el interior del portamuestras fueron transferidas de forma inmediata a un sistema de criodesecación de alto vacío Emitech K775 (Emitech, Watford, UK) con el objetivo de extraer el agua de las células por sublimación (Figura 28). Las muestras fueron criodesecadas durante un total de 17 horas a una presión de vacío de 10⁻⁵ mbar siguiendo el perfil de temperaturas mostrado en la Tabla 3, y desarrollado de acuerdo con los criterios establecidos por Warley y Skepper (Warley y Skepper; 2000).

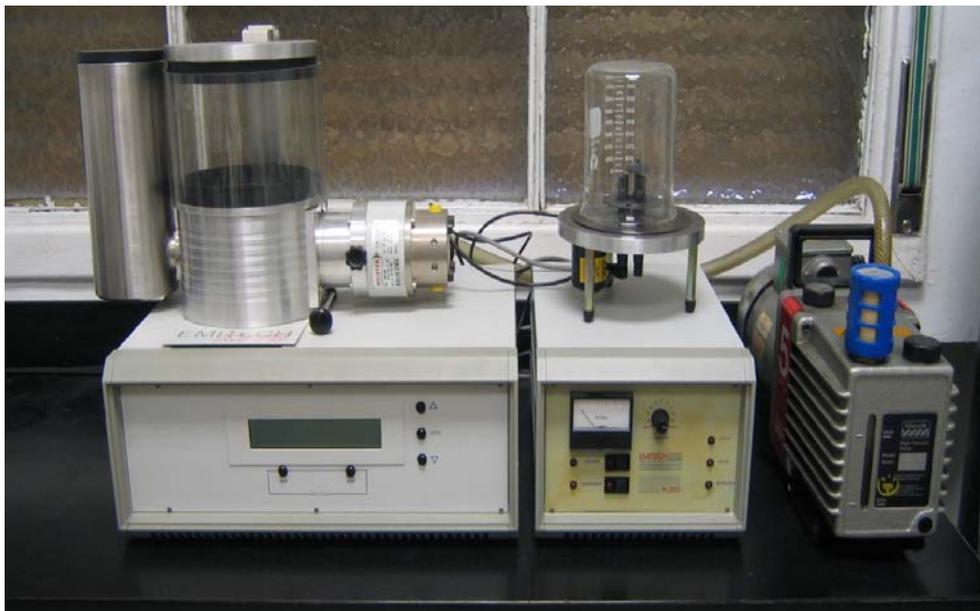


Figura 28. Criodesecador de alto vacío Emitech K775 (Emitech, Watford, UK) utilizado en esta Tesis Doctoral.

Tabla 3. Programa de intervalos de tiempo y temperaturas utilizados para la criodesecación de las muestras en un sistema de alto vacío			
Segmento	Temperatura inicial	Temperatura final	Tiempo
1	-100°C	-100°C	1 hora
2	-100°C	-70°C	1 hora
3	-70°C	-70°C	1 hora
4	-70°C	-50°C	1 hora
5	-50°C	-50°C	1 hora
6	-50°C	+25°C	12 horas

5) Montaje y recubrimiento de las muestras. Tras la criodesecación de las células, la última fase del protocolo consiste en recubrir a las muestras con una superficie conductora de electricidad, que facilite el barrido del haz de electrones durante su observación microscópica y detección analítica. Para ello, las rejillas criodesecadas y montadas sobre el portamuestras de aluminio fueron recubiertas con una capa de carbón mediante un evaporador (Emitech, Watford, UK) utilizando hilo de grafito.

6) Instrumentación, parámetros analíticos y condiciones de observación. En la presente Tesis Doctoral que describimos a continuación, hemos determinado el contenido iónico de sodio, magnesio, fósforo, azufre, cloro, calcio y potasio de nueve poblaciones celulares diferentes, analizándose 35 células en cada una de ellas:

- Condrocitos de disco articular del adulto humano del *primer pase* (primocultivo).
- Condrocitos de disco articular del adulto humano del *segundo pase* (primer subcultivo).
- Condrocitos de disco articular del adulto humano del *tercer pase* (segundo subcultivo).
- Condrocitos de disco articular del adulto humano del *cuarto pase* (tercer subcultivo).
- Condrocitos de disco articular del adulto humano del *quinto pase* (cuarto subcultivo).
- Condrocitos de disco articular del adulto humano del *sexto pase* (quinto subcultivo).

- Condrocitos de disco articular del adulto humano del *séptimo pase* (sexto subcultivo).
- Condrocitos de disco articular del adulto humano del *octavo pase* (séptimo subcultivo).
- Condrocitos de disco articular del adulto humano del *noveno pase* (octavo subcultivo).

La cuantificación del contenido iónico de los condrocitos de disco articular del adulto humano se llevó a cabo mediante microscopía electrónica analítica, utilizando un microscopio electrónico de barrido Phillips XL 30 (Phillips, Eindhoven, Holanda), equipado con una lente de objetivo cónico y un detector de energía dispersiva de rayos X con una ventana ultrafina CDU (EDAX, Eindhoven, Holanda). La configuración geométrica de este equipamiento posibilita la detección simultánea de electrones secundarios y rayos X, con una pequeña distancia de trabajo (10 mm) y un alto ángulo de toma (*take-off-angle*).

7) Observación de las muestras. Para la visualización de las muestras mediante electrones secundarios en el microscopio electrónico de barrido Phillips XL30, los parámetros fijados fueron los siguientes:

- Voltaje del microscopio10 KV
- Angulación de superficie.....35°
- Distancia de trabajo10mm

6. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL UTILIZANDO *MICROARRAY* DE ARN

Para el análisis de expresión génica se extrajo el ARN total de los condrocitos de los nueve pases celulares (primocultivo, primer, segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo subcultivos celulares de los condrocitos) mantenidos en cultivo utilizando el sistema comercial Qiagen RNeasy System (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá). Una vez extraído el ARN, se comprobó su integridad y su calidad mediante visualización directa del ARN ribosómico de 28 y 18S en ARN total separado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% y tinción con bromuro de etidio, así como mediante el sistema de análisis Agilent (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, EEUU).

A continuación, todos los ARNm fueron transformados en ADNc mediante una transcriptasa inversa (Superscript II, Life Technologies, Inc., Carlsbad, California, EEUU) con un oligonucleótido rico en colas de timina (T7-polyT primer), el cual permitió la amplificación de cualquier ARN mensajero presente en la célula.

Posteriormente, se sintetizaron los ARNc correspondientes a todos los ADNc mediante transcripción *in vitro*, utilizando para ello UTP y CTP marcados con biotina (Enzo diagnostics, Farmingdale, New York, EEUU). Una vez sintetizados, y para favorecer la hibridación, estos ARNc se fragmentaron químicamente añadiendo una concentración elevada de sales y aplicando altas temperaturas.

Finalmente, los ARNc marcados y fragmentados se hibridaron frente a los chips que constituyen el sistema de microarray Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0 de la casa comercial Affymetrix, durante 16 horas a 45°C. Este sistema incluye 54675 genes y secuencias génicas expresadas (EST), lo cual permite realizar un estudio global de todos los genes y funciones génicas existentes en una célula en un momento dado. Tras un proceso totalmente estandarizado y automatizado, los chips se lavaron y se escanearon para obtener valores absolutos de expresión génica expresados como unidades fluorescentes, en una escala arbitraria.

7. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD MEDIA

Para calcular el índice de Viabilidad Media (VM) para cada pase celular, los valores de viabilidad celular obtenidos con las técnicas de Live/Dead[®], azul tripán y microanálisis fueron previamente normalizados a valores z (*z-scores*), en los que la media global de ese pase celular es 0 y la desviación estándar es 1, usando la siguiente fórmula:

$$Z=(X-\mu)/\sigma$$

Donde μ es la media de viabilidad celular obtenida con cada método en cada pase, X es la viabilidad específica para cada pase celular, y σ es la desviación estándar para cada método en cada pase. De esta manera, se obtuvieron los valores z para cada uno de los nueve pases celulares analizados.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la presente Tesis Doctoral se han realizado dos tipos de comparaciones estadísticas. En primer lugar, se utilizó un test estadístico para la comparación de niveles de viabilidad celular obtenidos mediante las técnicas de Live/Dead[®], azul tripán y microanálisis. En segundo lugar, se realizó el análisis de los datos de expresión génica determinados mediante *microarray*.

- **Análisis de la viabilidad celular determinada mediante las técnicas mixtas metabólicas y de exclusión de colorantes vitales (Live/Dead[®]), técnicas de exclusión de colorantes vitales (azul tripán) y determinación del perfil iónico cuantitativo mediante microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X.**

Para la comparación global de la viabilidad de los nueve pases sucesivos analizados en esta Tesis Doctoral (pases 1 a 9 de condrocitos de disco articular del adulto humano) se ha utilizado la *prueba de W de Kendall*. Esta prueba se puede interpretar como el coeficiente de concordancia, que es una medida de acuerdo entre evaluadores. Cada caso es un juez o evaluador y cada variable es un elemento o persona que está siendo evaluada. Para cada variable se calcula la suma de rangos.

Para la comparación por pares, es decir, para identificar diferencias en cuanto a la viabilidad celular entre dos subcultivos sucesivos (pase 1 o primocultivo frente a pase

2 o primer subcultivo, pase 2 frente a pase 3 y así sucesivamente) se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

En todos los casos, se seleccionó un valor de significación $p < 0,05$ para las pruebas estadísticas de doble cola. Para la realización de las pruebas estadísticas mencionadas se utilizó el programa SPSS 16.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

- **Análisis de los patrones de expresión génica determinados mediante microarray.**

Una vez determinada la Viabilidad Media de cada pase celular, se procedió a calcular el índice de correlación de cada gen/EST incluido en el análisis de *microarray* respecto a dicha Viabilidad Media. De este modo, se pudo identificar una serie de genes/EST cuyo comportamiento a lo largo de los nueve pases celulares se correlacionaba de forma positiva o negativa con la Viabilidad Media en esos nueve pases. Para ello, se utilizó el test de correlación de Spearman, considerándose significativos aquellos genes/EST cuyo índice de correlación R fuese $> 0,7$ (correlación positiva) ó $-0,7$ (correlación negativa). Este tipo de análisis se realizó de modo no supervisado (usando todos los genes/EST del *array*) y supervisado (usando sólo los 371 genes/EST relacionados con viabilidad celular y apoptosis).

Para determinar el perfil genético global existente en los genes con correlación significativa positiva o negativa, se utilizaron los programas informáticos BINGO[®] y Cytoscape[®] (Boyer *et al.*; 2006). Estos programas permiten identificar aquellas funciones génicas que son especialmente abundantes en el conjunto de genes/EST seleccionados, calculando un valor estadístico p de acuerdo con una distribución hipergeométrica. De esta manera, el valor p calculado indica la posibilidad de que tal enriquecimiento génico funcional ocurra por simple azar.

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CONDROCITOS DE DISCO ARTICULAR DE LA ATM DEL ADULTO HUMANO

Los condrocitos fueron obtenidos de disco articular de la ATM del adulto humano mediante los métodos y técnicas descritas en el apartado de Materiales y Métodos de esta Tesis Doctoral. Estas células mostraron adecuados niveles de proliferación celular en los nueve pases analizados en nuestro trabajo. El grado de confluencia del primocultivo o primer pase celular se obtuvo en un periodo aproximado de 14 días, y los pases celulares posteriores en un promedio de 5-6 días para cada pase.

Una vez cultivados, los condrocitos mostraron una morfología estrellada y poligonal a lo largo de los nueve pases celulares (Figuras 29 y 30). No se observaron signos de contaminación de la población celular y el proceso de tripsinización resultó similar en los nueve pases celulares sin cambios macroscópicos evidentes.

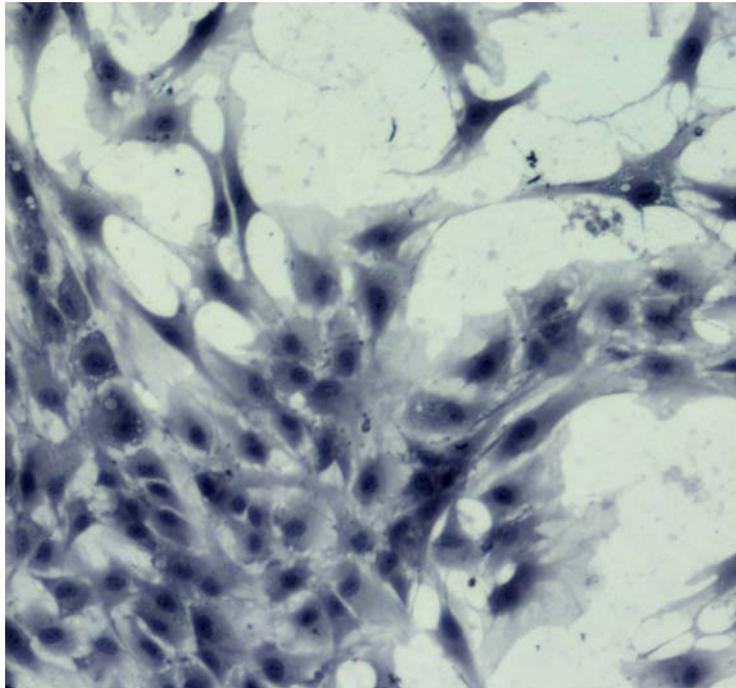


Figura 29. Imagen histológica de los condrocitos de la ATM del adulto humano. Tinción AA, 20x.

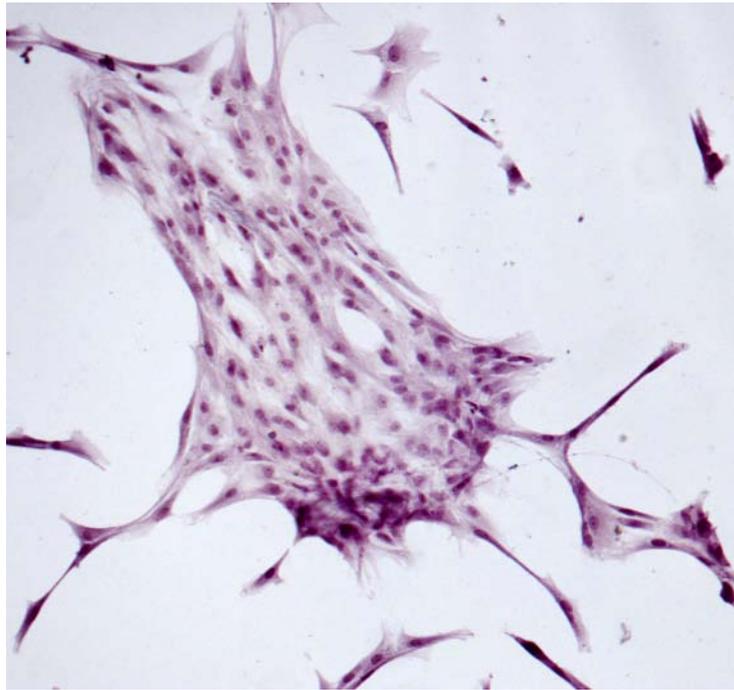


Figura 30. Imagen histológica de los condrocitos de la ATM del adulto humano. Tinción HE, 10x.

2. VIABILIDAD CELULAR DETERMINADA MEDIANTE TÉCNICAS MIXTAS METABÓLICAS Y DE EXCLUSIÓN DE COLORANTES VITALES (LIVE/DEAD®)

A continuación, se muestran los resultados del análisis de viabilidad de condrocitos de disco articular de la ATM del adulto humano analizados en este estudio a lo largo de los nueve pases celulares (primocultivo y ocho subcultivos) realizados mediante la técnica Live/Dead® (Figuras 31 y 32). Estos resultados se detallan en la Tabla 4 y se expresan gráficamente en la Figura 33. En dicha Tabla se muestran los valores medios de viabilidad celular de cada pase.

En la Figura 33 podemos observar que existe variabilidad en cuanto a la viabilidad de los distintos pases o subcultivos celulares. Inicialmente observamos que el pase uno y dos presentan la menor tasa de viabilidad. A partir de ahí, existe una tendencia al aumento de la viabilidad celular desde el pase tres hasta el séptimo, en donde observamos la máxima viabilidad. En el pase octavo y noveno la tendencia se invierte hacia el descenso de la viabilidad, aunque no se alcanzan niveles tan bajos como en los primeros pases.

El análisis estadístico de los resultados de viabilidad celular determinados mediante la técnica Live/Dead® demostró que las diferencias globales de viabilidad entre los nueve pases celulares analizados en esta Tesis no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$ para el coeficiente de concordancia de Kendall).

Posteriormente, la comparación por pares o dos pases consecutivos entre sí reveló la existencia de diferencias en cuanto a la supervivencia celular no estadísticamente significativas ($p > 0,05$ para el test de Wilcoxon para todas las comparaciones). Los resultados obtenidos en el análisis estadístico de la viabilidad celular determinada mediante la técnica Live/Dead® se muestran en las Tablas 5 y 6.

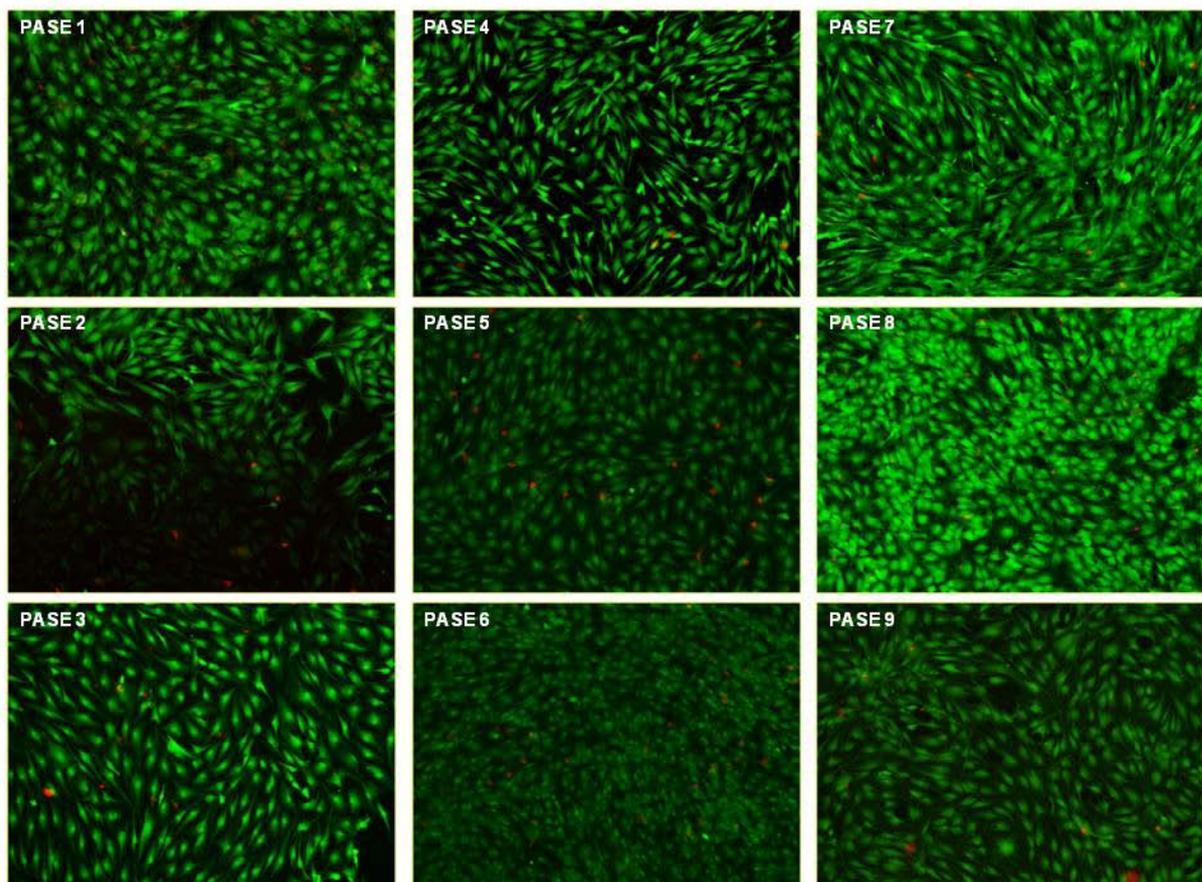


Figura 31. Imagen histológica de los condrocitos de la ATM del adulto humano obtenidas mediante la técnica Live/Dead® en los 9 pases celulares, 10x.

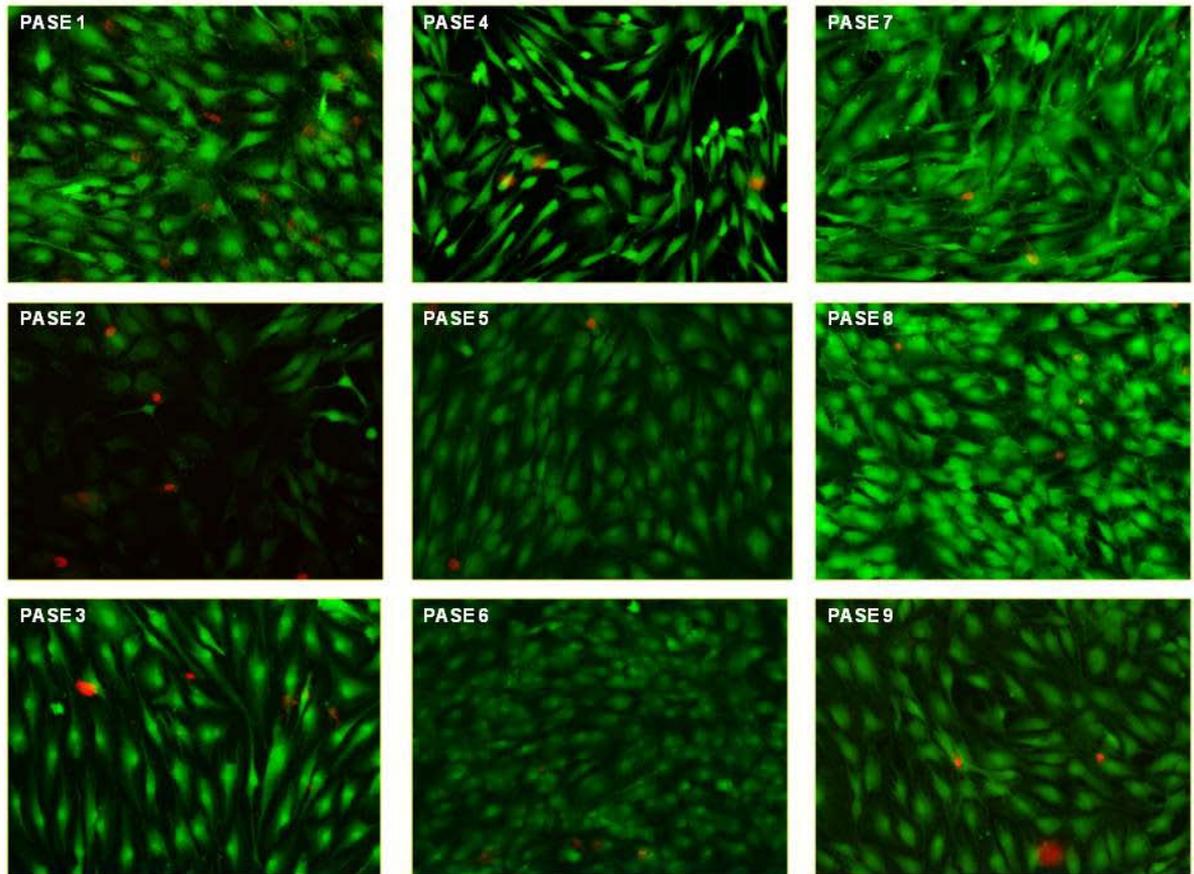


Figura 32. Imagen histológica de los condrocitos de la ATM del adulto humano obtenidas mediante la técnica Live/Dead[®] en los 9 pases celulares (selección a mayor aumento de la imagen mostrada en la Figura 31).

Tabla 4. Valores medios en forma de porcentaje de células viables de acuerdo con la técnica de Live/Dead®.

	Media	Desviación estándar
P1 (primocultivo)	91,2870296	5,51038851
P2 (primer subcultivo)	89,6450654	8,16019297
P3 (segundo subcultivo)	95,3889276	4,68050183
P4 (tercer subcultivo)	95,0225996	2,1423126
P5 (cuarto subcultivo)	96,2924095	1,8779531
P6 (quinto subcultivo)	96,7713596	1,47503552
P7 (sexto subcultivo)	97,3838063	1,6563265
P8 (séptimo subcultivo)	94,6985745	2,31460523
P9 (octavo subcultivo)	93,5934263	2,675979

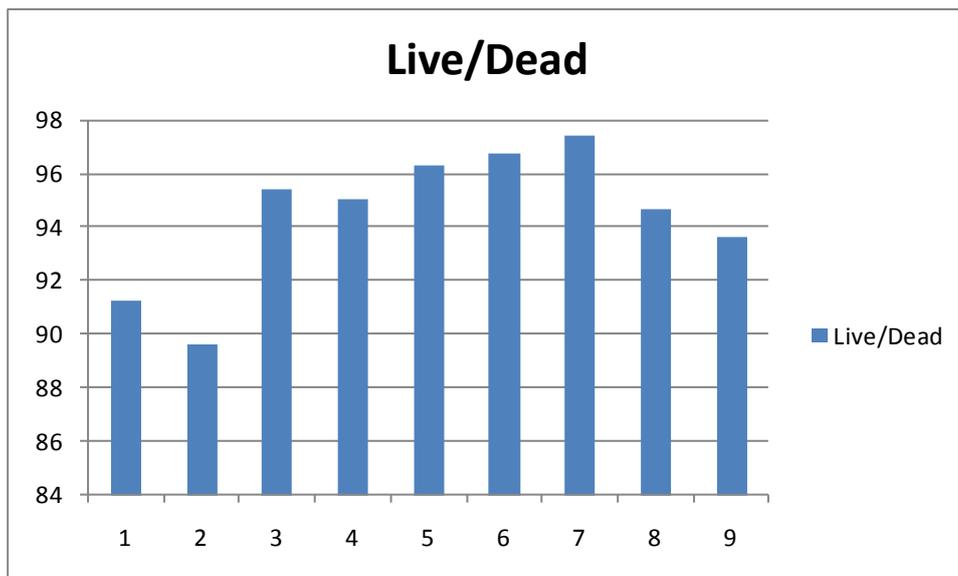


Figura 33. Histograma donde se representa los valores medios de viabilidad de cada pase celular con la técnica de Live/Dead®. 1: pase1 (primocultivo). 2: pase 2 (primer subcultivo). 3: pase3 (segundo subcultivo). 4: pase 4 (tercer subcultivo). 5: pase 5 (cuarto subcultivo). 6: pase 6 (quinto subcultivo). 7: pase 7 (sexto subcultivo). 8: pase 8 (séptimo subcultivo). 9: pase 9 (octavo subcultivo).

Tabla 5. Análisis estadístico global para la comparación de supervivencia media en cada pase celular utilizando el Coeficiente de Concordancia de Kendall (análisis de los nueve pases celulares en conjunto). Las diferencias de viabilidad no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

N	4
W de Kendall(a)	0,275
Chi-cuadrado	8,800
gl	8
Sig. asintót.	0,359

a. Coeficiente de concordancia de Kendall

Tabla 6. Análisis estadístico para la comparación de los valores de supervivencia medios en dos pases celulares consecutivos utilizando la prueba estadística de Wilcoxon. P1: pase 1 (primocultivo). P2: pase 2 (primer subcultivo). P3: pase 3 (segundo subcultivo). P4: pase 4 (tercer subcultivo). P5: pase 5 (cuarto subcultivo). P6: pase 6 (quinto subcultivo). P7: pase 7 (sexto subcultivo). P8: pase 8 (séptimo subcultivo). P9: pase 9 (octavo subcultivo). Las diferencias de viabilidad no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

	P1 – P2	P2 – P3	P3 – P4	P4 – P5	P5 – P6	P6 – P7	P7 – P8	P8 – P9
Z	-,314(a)	-1,363(b)	-,105(a)	-1,153(b)	-,365(a)	,000(c)	-1,782(a)	-1,363(a)
Sig. asintót. (bilateral)	0,753	0,173	0,917	0,249	0,715	1,000	0,075	0,173

a. Basado en los rangos positivos

b. Basado en los rangos negativos

c. La suma de rangos negativos es igual a la suma de rangos positivos

d. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

3. VIABILIDAD CELULAR DETERMINADA MEDIANTE TÉCNICAS DE EXCLUSIÓN DE COLORANTES VITALES (AZUL TRIPÁN)

El análisis de viabilidad realizado en los distintos pases de condrocitos de disco articular de la ATM del adulto humano (primocultivo y ocho subcultivos) realizados mediante la técnica de azul tripán se indican en la Tabla 7 y se expresan gráficamente en la Figura 34. En dicha Tabla se muestran los valores medios en forma de porcentaje de células viables respecto a aquellas que han incorporado el colorante.

En la Figura 34 podemos observar que existe variabilidad en cuanto a la viabilidad de los distintos pases o subcultivos celulares. Así, inicialmente se observa como existe una tendencia a la disminución de la viabilidad celular desde el pase dos hasta el cuarto. A partir de aquí, la tendencia se invierte hacia el aumento de la viabilidad, alcanzando la máxima viabilidad en el pase seis. A continuación, la viabilidad celular comienza a descender hasta el pase nueve donde encontramos la menor viabilidad.

El análisis estadístico de los resultados de viabilidad celular determinados mediante la técnica de azul tripán demostró la existencia de diferencias globales entre los nueve pases celulares analizados en esta Tesis ($p=0,000$ para el coeficiente de concordancia de Kendall).

Posteriormente, la comparación por pares o dos pases consecutivos entre sí reveló la existencia de diferencias significativas en cuanto a la supervivencia celular cuando se compararon entre sí el pase 2 y el 3, el pase 4 y el 5, el pase 5 y el 6, el pase 6 y el 7 y el pase 8 y el 9 ($p=0,026$ para el test de Wilcoxon para todas las comparaciones). Los resultados obtenidos en el análisis estadístico de la viabilidad celular determinada mediante la técnica de azul tripán se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 7. Valores medios en forma de porcentaje de células viables respecto de aquellas que han incorporado el colorante con la técnica de azul tripán.

	Media	Desviación estándar
P1 (primocultivo)	96,7974654	1,43254888
P2 (primer subcultivo)	98,0380102	1,20765976
P3 (segundo subcultivo)	95,3317787	1,1079607
P4 (tercer subcultivo)	93,9527296	3,94250925
P5 (cuarto subcultivo)	98,5712941	0,56254317
P6 (quinto subcultivo)	99,459044	0,07178541
P7 (sexto subcultivo)	98,0940957	0,39582147
P8 (séptimo subcultivo)	96,8652788	2,30118503
P9 (octavo subcultivo)	93,3627608	3,32555838

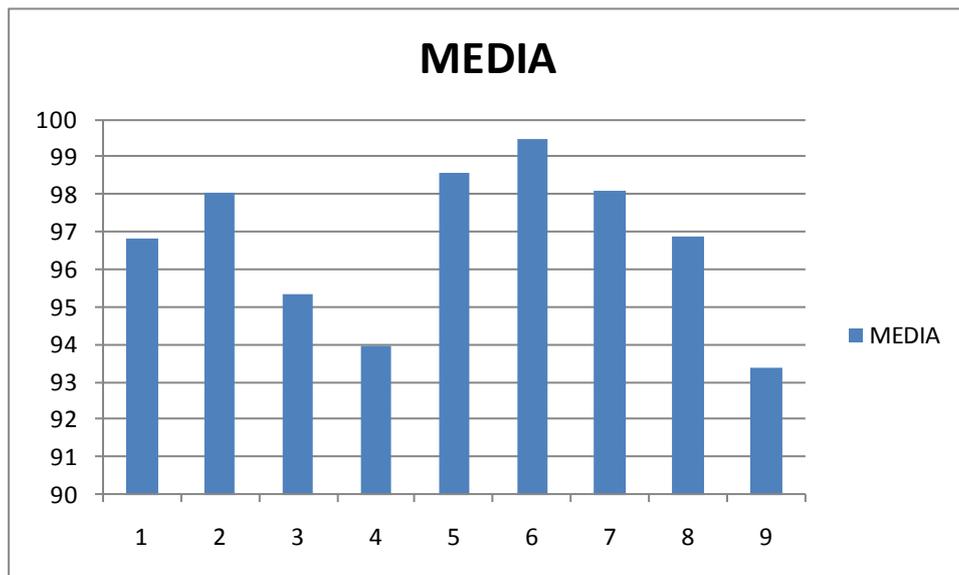


Figura 34. Histograma donde se representan los valores medios de viabilidad de cada pase celular con la técnica de azul tripán. 1: pase 1 (primocultivo). 2: pase 2 (primer subcultivo). 3: pase 3 (segundo subcultivo). 4: pase 4 (tercer subcultivo). 5: pase 5 (cuarto subcultivo). 6: pase 6 (quinto subcultivo). 7: pase 7 (sexto subcultivo). 8: pase 8 (séptimo subcultivo). 9: pase 9 (octavo subcultivo).

Tabla 8. Análisis estadístico global para la comparación de supervivencia media en cada pase celular utilizando el Coeficiente de Concordancia de Kendall (análisis de los nueve pases celulares en conjunto). Se señala en amarillo el valor de significación p .

N	6
W de Kendall(a)	0,689
Chi-cuadrado	33,067
gl	8
Sig. asintót.	0,000

a. Coeficiente de concordancia de Kendall

Tabla 9. Análisis estadístico para la comparación de los valores de supervivencia medios en dos pases celulares consecutivos utilizando la prueba estadística de Wilcoxon. P1: pase 1 (primocultivo). P2: pase 2 (primer subcultivo). P3: pase 3 (segundo subcultivo). P4: pase 4 (tercer subcultivo). P5: pase 5 (cuarto subcultivo). P6: pase 6 (quinto subcultivo). P7: pase 7 (sexto subcultivo). P8: pase 8 (séptimo subcultivo). P9: pase 9 (octavo subcultivo). Se señalan en amarillo los valores de significación p que resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

	P2 - P1	P3 - P2	P4 - P3	P5 - P4	P6 - P5	P7 - P6	P8 - P7	P9 - P8
Z	-1,586(a)	-2,220(b)	-,106(b)	-2,220(a)	-2,220(a)	-2,220(b)	-1,586(b)	-2,220(b)
Sig. asintót. (bilateral)	0,113	0,026	0,916	0,026	0,026	0,026	0,113	0,026

a. Basado en los rangos negativos

b. Basado en los rangos positivos

c. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

4. VIABILIDAD CELULAR DETERMINADA MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL PERFIL IÓNICO CUANTITATIVO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA ANALÍTICA POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X

La utilización de la microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X nos permitió obtener espectros individualizados para cada una de las células de disco articular analizadas en este estudio. En cada uno de esos espectros se observaron los picos correspondientes a los diferentes elementos existentes a nivel intracelular, así como el fondo o *background* correspondiente a la emisión de la radiación no característica. En cada pase celular se han analizado 35 células. En las Tablas 10 a 18 se muestran los contenidos intracelulares medios de sodio (Na), magnesio (Mg), fósforo (P), azufre (S), cloro (Cl), potasio (K) y calcio (Ca) obtenidos del análisis de 35 células en cada pase celular y, de forma gráfica, en las Figuras 35 a 41. Finalmente, en la Figura 42, se representan los índices *potasio/sodio* (K/Na) para cada pase celular.

El análisis estadístico de los valores medios de las distintas concentraciones iónicas en los diferentes pases celulares de los condrocitos de disco articular de la ATM del adulto humano demostró la existencia de diferencias globales entre los 9 pases celulares analizados para sodio, magnesio, fósforo, azufre, cloro, potasio y calcio (Tabla 19). Sin embargo, cuando se realizó una comparación por pares de pases consecutivos utilizando la prueba de Wilcoxon, se pudo detectar la presencia de diferencias significativas para todos los elementos, aunque únicamente para pases celulares específicos (Tablas 20 a 26).

Tabla 10. Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca obtenidos del análisis de 35 células del primer pase de condrocitos de disco articular. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco, así como la razón K/Na media.

PASE 1	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
Media	53,38	21,39	258,45	88,21	137,70	253,02	10,05	4,74
Desviación Estándar	22,82	5,94	27,80	21,94	29,70	78,90	8,86	

Tabla 11. Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca obtenidos del análisis de 35 células del segundo pase de condrocitos de disco articular. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco, así como la razón K/Na media.

PASE 2	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
Media	84,65	19,38	226,52	64,78	144,81	182,50	9,62	2,16
Desviación Estándar	36,43	5,33	44,88	10,36	47,26	45,40	7,02	

Tabla 12. Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca obtenidos del análisis de 35 células del tercer pase de condrocitos de disco articular. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco, así como la razón K/Na media.

PASE 3	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
Media	43,62	18,34	191,81	58,46	95,64	167,79	14,27	3,85
Desviación Estándar	19,47	6,05	59,92	11,58	31,81	65,77	12,38	

Tabla 13. Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca obtenidos del análisis de 35 células del cuarto pase de condrocitos de disco articular. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco, así como la razón K/Na media.

PASE 4	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
Media	58,86	25,75	282,71	78,22	115,31	279,50	13,03	4,75
Desviación Estándar	28,73	7,89	56,77	20,97	40,88	93,11	8,64	

Tabla 14. Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca obtenidos del análisis de 35 células del quinto pase de condrocitos de disco articular. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco, así como la razón K/Na media.

PASE 5	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
Media	43,77	22,62	226,68	64,64	123,25	253,82	7,28	5,80
Desviación Estándar	29,07	6,67	43,70	21,90	30,58	66,38	7,18	

Tabla 15. Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca obtenidos del análisis de 35 células del sexto pase de condrocitos de disco articular. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco, así como la razón K/Na media.

PASE 6	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
Media	43,21	20,99	280,67	96,89	165,92	303,73	8,35	7,03
Desviación Estándar	27,18	5,84	83,92	20,21	50,21	91,13	11,32	

Tabla 16. Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca obtenidos del análisis de 35 células del séptimo pase de condrocitos de disco articular. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco, así como la razón K/Na media.

PASE 7	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
Media	36,16	16,09	190,62	53,17	111,19	189,92	7,56	5,25
Desviación Estándar	28,34	4,11	55,23	13,30	48,16	64,17	10,93	

Tabla 17. Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca obtenidos del análisis de 35 células del octavo pase de condrocitos de disco articular. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco, así como la razón K/Na media.

PASE 8	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
Media	53,24	30,05	311,61	67,27	126,87	311,74	4,83	5,86
Desviación Estándar	18,45	8,98	69,75	15,37	43,61	107,78	5,49	

Tabla 18. Contenidos intracelulares medios de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca obtenidos del análisis de 35 células del noveno pase de condrocitos de disco articular. Se muestra la concentración intracelular de cada elemento en milimoles por kilogramo de peso celular seco, así como la razón K/Na media.

PASE 9	[Na]	[Mg]	[P]	[S]	[Cl]	[K]	[Ca]	K/Na
Media	97,78	23,22	233,25	61,37	132,34	203,77	10,28	2,08
Desviación Estándar	71,59	8,60	95,32	18,03	50,44	67,85	9,49	

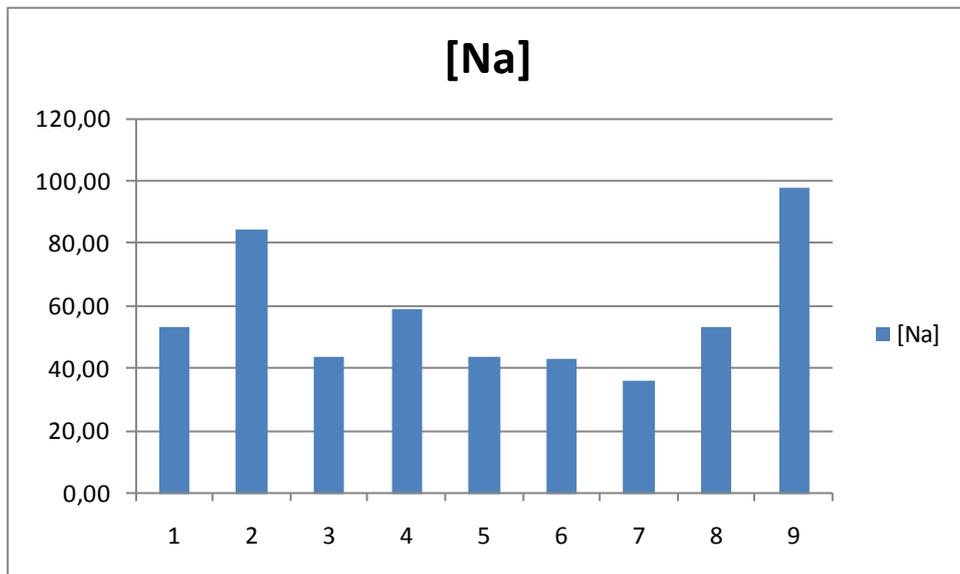


Figura 35. Histograma representativo de las concentraciones medias de sodio en los nueve pases celulares analizados en esta Tesis Doctoral en los condrocitos de disco articular de la ATM del adulto humano. El eje de ordenadas corresponde a las concentraciones de sodio en milimoles por Kg de peso celular seco. 1: pase 1 (primocultivo). 2: pase 2 (primer subcultivo). 3: pase 3 (segundo subcultivo). 4: pase 4 (tercer subcultivo). 5: pase 5 (cuarto subcultivo). 6: pase 6 (quinto subcultivo). 7: pase 7 (sexto subcultivo). 8: pase 8 (séptimo subcultivo). 9: pase 9 (octavo subcultivo).

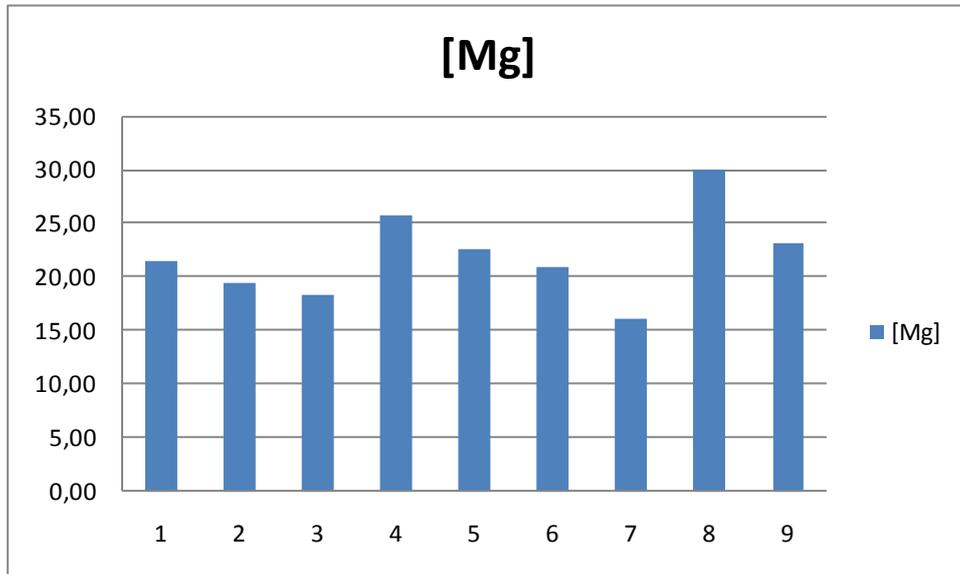


Figura 36. Histograma representativo de las concentraciones medias de magnesio en los nueve pases celulares analizados en esta Tesis Doctoral en los condrocitos de disco articular de la ATM del adulto humano. El eje de ordenadas corresponde a las concentraciones de magnesio en milimoles por Kg de peso celular seco. 1: pase 1 (primocultivo). 2: pase 2 (primer subcultivo). 3: pase 3 (segundo subcultivo). 4: pase 4 (tercer subcultivo). 5: pase 5 (cuarto subcultivo). 6: pase 6 (quinto subcultivo). 7: pase 7 (sexto subcultivo). 8: pase 8 (séptimo subcultivo). 9: pase 9 (octavo subcultivo).

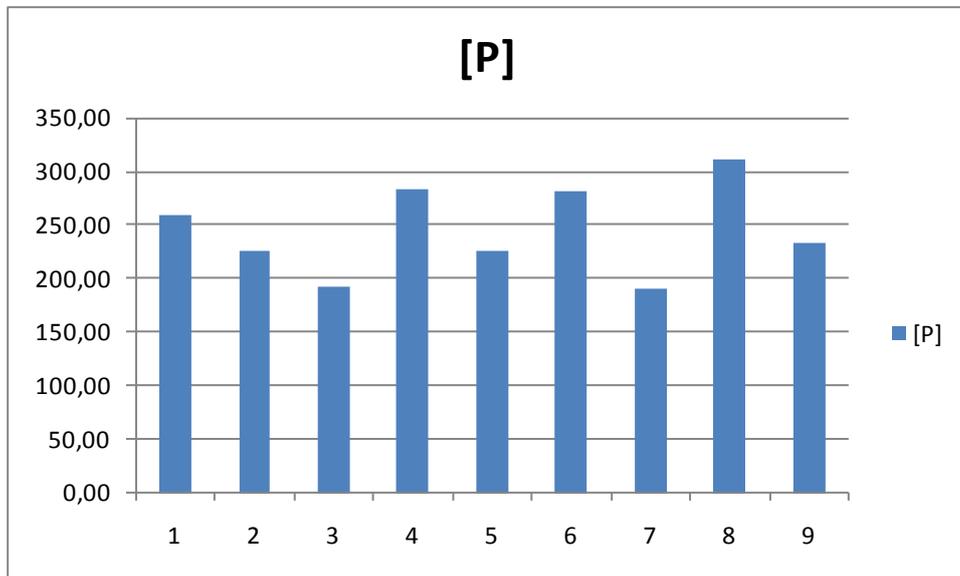


Figura 37. Histograma representativo de las concentraciones medias de fósforo en los nueve pases celulares analizados en esta Tesis Doctoral en los condrocitos de disco articular de la ATM del adulto humano. El eje de ordenadas corresponde a las concentraciones de fósforo en milimoles por Kg de peso celular seco. 1: pase 1 (primocultivo). 2: pase 2 (primer subcultivo). 3: pase 3 (segundo subcultivo). 4: pase 4 (tercer subcultivo). 5: pase 5 (cuarto subcultivo). 6: pase 6 (quinto subcultivo). 7: pase 7 (sexto subcultivo). 8: pase 8 (séptimo subcultivo). 9: pase 9 (octavo subcultivo).

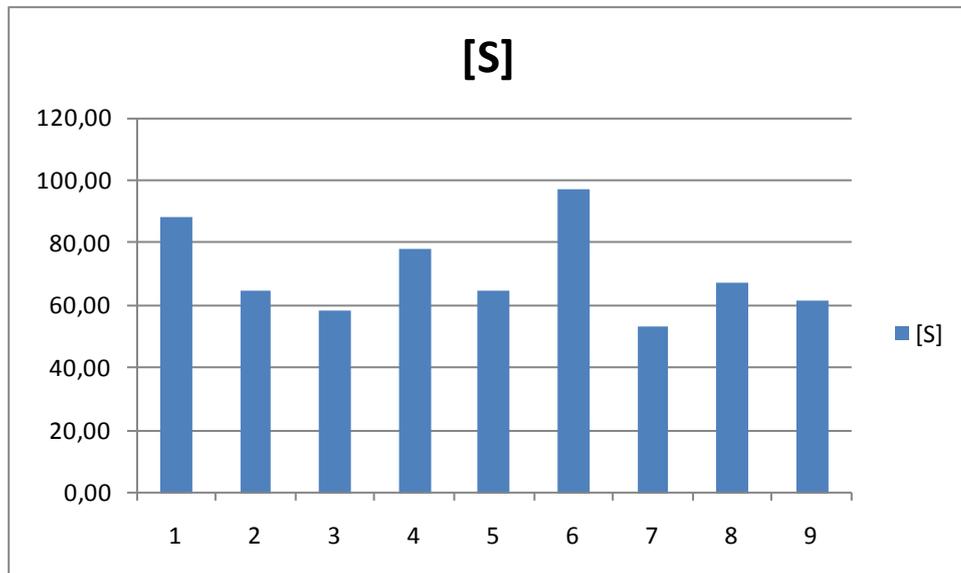


Figura 38. Histograma representativo de las concentraciones medias de azufre en los nueve pases celulares analizados en esta Tesis Doctoral en los condrocitos de disco articular de la ATM del adulto humano. El eje de ordenadas corresponde a las concentraciones de azufre en milimoles por Kg de peso celular seco. 1: pase 1 (primocultivo). 2: pase 2 (primer subcultivo). 3: pase 3 (segundo subcultivo). 4: pase 4 (tercer subcultivo). 5: pase 5 (cuarto subcultivo). 6: pase 6 (quinto subcultivo). 7: pase 7 (sexto subcultivo). 8: pase 8 (séptimo subcultivo). 9: pase 9 (octavo subcultivo).

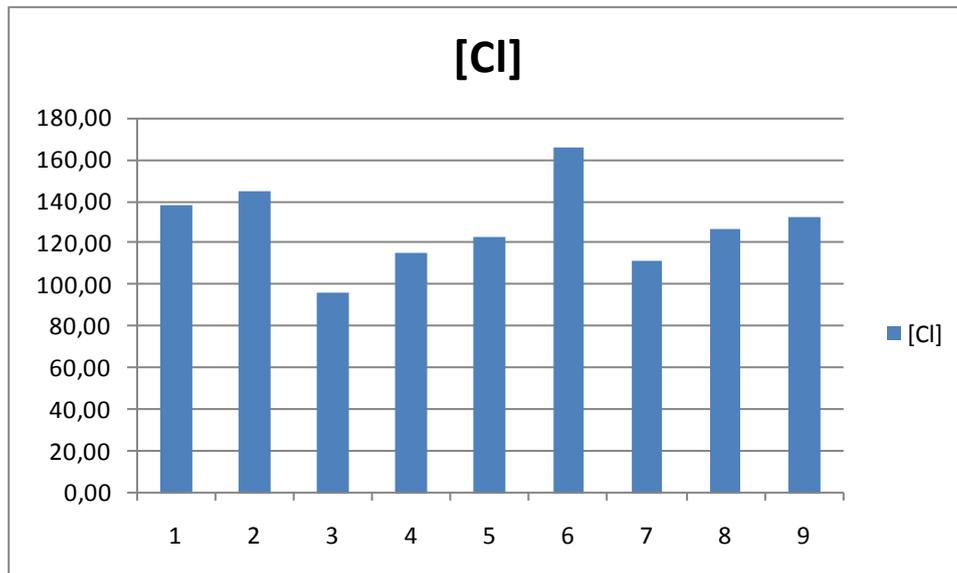


Figura 39. Histograma representativo de las concentraciones medias de cloro en los nueve pases celulares analizados en esta Tesis Doctoral en los condrocitos de disco articular de la ATM del adulto humano. El eje de ordenadas corresponde a las concentraciones de cloro en milimoles por Kg de peso celular seco. 1: pase 1 (primocultivo). 2: pase 2 (primer subcultivo). 3: pase 3 (segundo subcultivo). 4: pase 4 (tercer subcultivo). 5: pase 5 (cuarto subcultivo). 6: pase 6 (quinto subcultivo). 7: pase 7 (sexto subcultivo). 8: pase 8 (séptimo subcultivo). 9: pase 9 (octavo subcultivo).

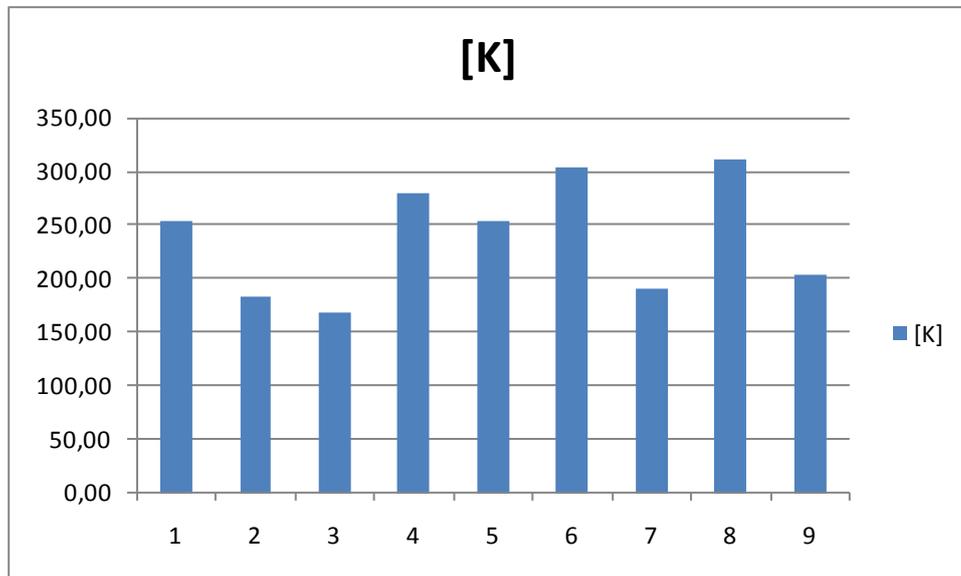


Figura 40. Histograma representativo de las concentraciones medias de potasio en los nueve pases celulares analizados en esta Tesis Doctoral en los condrocitos de disco articular de la ATM del adulto humano. El eje de ordenadas corresponde a las concentraciones de potasio en milimoles por Kg de peso celular seco. 1: pase 1 (primocultivo). 2: pase 2 (primer subcultivo). 3: pase 3 (segundo subcultivo). 4: pase 4 (tercer subcultivo). 5: pase 5 (cuarto subcultivo). 6: pase 6 (quinto subcultivo). 7: pase 7 (sexto subcultivo). 8: pase 8 (séptimo subcultivo). 9: pase 9 (octavo subcultivo).

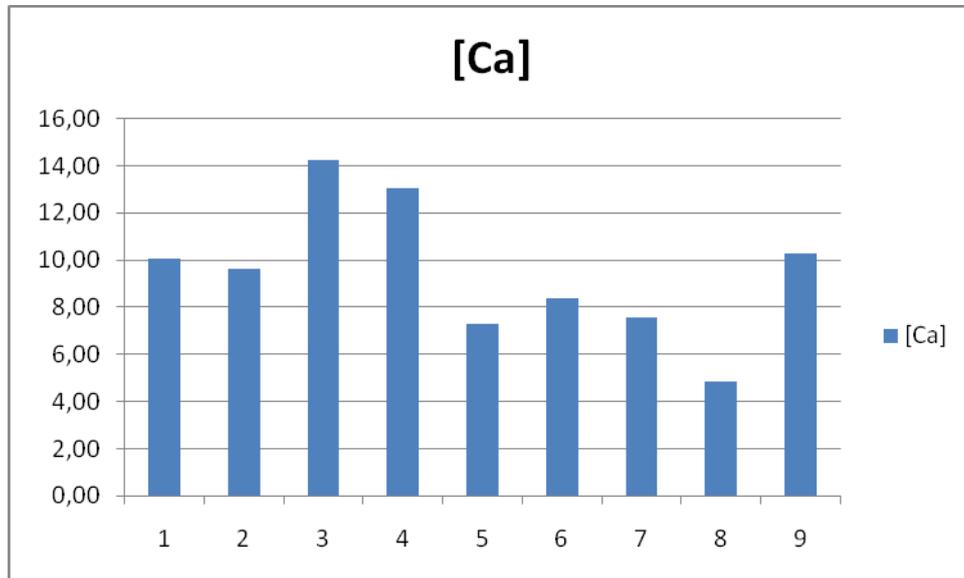


Figura 41. Histograma representativo de las concentraciones medias de calcio en los nueve pases celulares analizados en esta Tesis Doctoral en los condrocitos de disco articular de la ATM del adulto humano. El eje de ordenadas corresponde a las concentraciones de calcio en milimoles por Kg de peso celular seco. 1: pase 1 (primocultivo). 2: pase 2 (primer subcultivo). 3: pase 3 (segundo subcultivo). 4: pase 4 (tercer subcultivo). 5: pase 5 (cuarto subcultivo). 6: pase 6 (quinto subcultivo). 7: pase 7 (sexto subcultivo). 8: pase 8 (séptimo subcultivo). 9: pase 9 (octavo subcultivo).

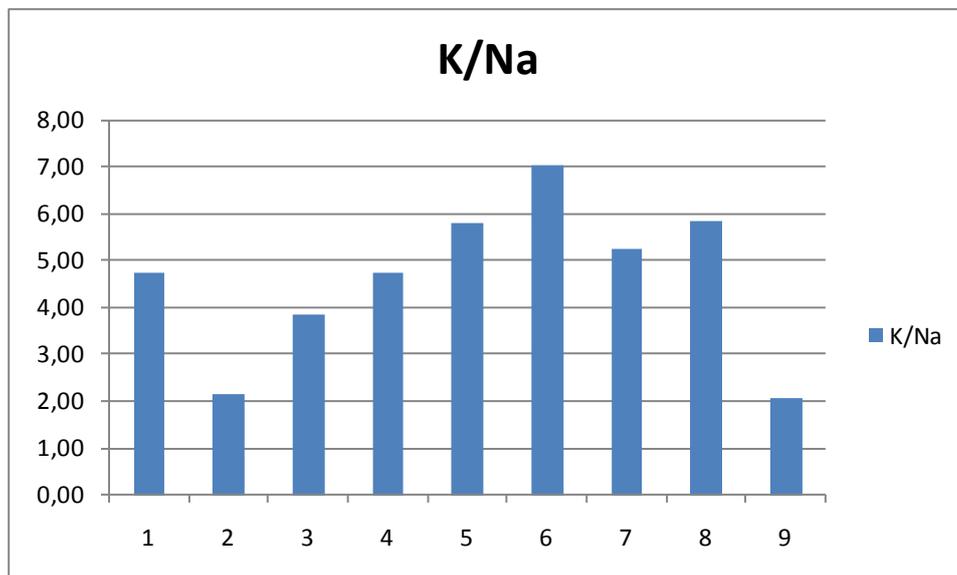


Figura 42. Histograma representativo de los índices potasio/sodio (K/Na) correspondientes a cada pase celular analizado. 1: pase 1 (primocultivo). 2: pase 2 (primer subcultivo). 3: pase 3 (segundo subcultivo). 4: pase 4 (tercer subcultivo). 5: pase 5 (cuarto subcultivo). 6: pase 6 (quinto subcultivo). 7: pase 7 (sexto subcultivo). 8: pase 8 (séptimo subcultivo). 9: pase 9 (octavo subcultivo).

Tabla 19. Análisis estadístico global para la comparación de las concentraciones medias de Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca en cada pase celular utilizando el Coeficiente de Concordancia de Kendall (análisis de los nueve pases celulares en conjunto para cada elemento). Se señala en amarillo los valores de significación p que resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

	N (35)	W de Kendall	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintót.
Na	35	0,288735805	80,8460253	8	0,00000
Mg	35	0,241497575	67,6193209	8	0,00000
P	35	0,313836414	87,87419585	8	0,00000
S	35	0,379103053	106,148855	8	0,00000
Cl	35	0,198631023	55,61668653	8	0,00000
K	35	0,3517955	98,50274005	8	0,00000
Ca	35	0,111936985	31,34235589	8	0,00012

Tabla 20. Análisis estadístico para la comparación de las concentraciones medias de sodio en dos pases celulares consecutivos utilizando la prueba estadística de Wilcoxon. P1: pase 1 (primocultivo). P2: pase 2 (primer subcultivo). P3: pase 3 (segundo subcultivo). P4: pase 4 (tercer subcultivo). P5: pase 5 (cuarto subcultivo). P6: pase 6 (quinto subcultivo). P7: pase 7 (sexto subcultivo). P8: pase 8 (séptimo subcultivo). P9: pase 9 (octavo subcultivo). Se señalan en amarillo los valores de significación p que resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Sodio – Estadísticos de contraste (a)

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
P1-P2	-3,546560215	0,00039
P2-P3	-4,693096629	0,00000
P3-P4	-2,530959554	0,01138
P4-P5	-2,604502094	0,00920
P5-P6	-0,188089157	0,85081
P6-P7	-2,097304097	0,03597
P7-P8	-4,529744542	0,00001
P8-P9	-3,120513078	0,00181

a. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Tabla 21. Análisis estadístico para la comparación de las concentraciones medias de magnesio en dos pases celulares consecutivos utilizando la prueba estadística de Wilcoxon. P1: pase 1 (primocultivo). P2: pase 2 (primer subcultivo). P 3: pase3 (segundo subcultivo). P4: pase 4 (tercer subcultivo). P5: pase 5 (cuarto subcultivo). P6: pase 6 (quinto subcultivo). P7: pase 7 (sexto subcultivo). P8: pase 8 (séptimo subcultivo). P9: pase 9 (octavo subcultivo). Se señalan en amarillo los valores de significación p que resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Magnesio – Estadísticos de contraste (a)

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
P1-P2	-1,317274181	0,18775
P2-P3	-0,802955069	0,42200
P3-P4	-3,579563047	0,00034
P4-P5	-2,557033477	0,01056
P5-P6	-1,008989354	0,31298
P6-P7	-3,892331359	0,00010
P7-P8	-5,053035728	0,00000
P8-P9	-3,010471916	0,00261

a. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Tabla 22. Análisis estadístico para la comparación de las concentraciones medias de fósforo en dos pases celulares consecutivos utilizando la prueba estadística de Wilcoxon. P1: pase 1 (primocultivo). P2: pase 2 (primer subcultivo). P3: pase 3 (segundo subcultivo). P4: pase 4 (tercer subcultivo). P5: pase 5 (cuarto subcultivo). P6: pase 6 (quinto subcultivo). P7: pase 7 (sexto subcultivo). P8: pase 8 (séptimo subcultivo). P9: pase 9 (octavo subcultivo). Se señalan en amarillo los valores de significación p que resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Fósforo – Estadísticos de contraste (a)

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
P1-P2	-3,214203561	0,00131
P2-P3	-1,572908126	0,11574
P3-P4	-3,620033398	0,00029
P4-P5	-4,700892856	0,00000
P5-P6	-2,072031072	0,03826
P6-P7	-4,40598946	0,00001
P7-P8	-4,717272273	0,00000
P8-P9	-3,406861739	0,00066

a. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Tabla 23. Análisis estadístico para la comparación de las concentraciones medias de azufre en dos pases celulares consecutivos utilizando la prueba estadística de Wilcoxon. P1: pase 1 (primocultivo). P2: pase 2 (primer subcultivo). P3: pase 3 (segundo subcultivo). P4: pase 4 (tercer subcultivo). P5: pase 5 (cuarto subcultivo). P6: pase 6 (quinto subcultivo). P7: pase 7 (sexto subcultivo). P8: pase 8 (séptimo subcultivo). P9: pase 9 (octavo subcultivo). Se señalan en amarillo los valores de significación p que resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Azufre – Estadísticos de contraste (a)

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
P1-P2	-4,013293801	0,00006
P2-P3	-2,178681745	0,02936
P3-P4	-3,399242175	0,00068
P4-P5	-2,981203975	0,00287
P5-P6	-4,47165599	0,00001
P6-P7	-5,15977611	0,00000
P7-P8	-3,538250861	0,00040
P8-P9	-1,786683751	0,07399

a. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Tabla 24. Análisis estadístico para la comparación de las concentraciones medias de cloro en dos pases celulares consecutivos utilizando la prueba estadística de Wilcoxon. P1: pase 1 (primocultivo). P2: pase 2 (primer subcultivo). P3: pase 3 (segundo subcultivo). P4: pase 4 (tercer subcultivo). P5: pase 5 (cuarto subcultivo). P6: pase 6 (quinto subcultivo). P7: pase 7 (sexto subcultivo). P8: pase 8 (séptimo subcultivo). P9: pase 9 (octavo subcultivo). Se señalan en amarillo los valores de significación p que resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Cloro – Estadísticos de contraste (a)

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
P1-P2	-0,854872608	0,39262
P2-P3	-4,258577174	0,00002
P3-P4	-2,154037896	0,03124
P4-P5	-1,236666766	0,21621
P5-P6	-3,488757454	0,00049
P6-P7	-3,881121642	0,00010
P7-P8	-2,800927378	0,00510
P8-P9	-0,409478574	0,68219

a. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Tabla 25. Análisis estadístico para la comparación de las concentraciones medias de potasio en dos pases celulares consecutivos utilizando la prueba estadística de Wilcoxon. P1: pase 1 (primocultivo). P2: pase 2 (primer subcultivo). P3: pase 3 (segundo subcultivo). P4: pase 4 (tercer subcultivo). P5: pase 5 (cuarto subcultivo). P6: pase 6 (quinto subcultivo). P7: pase 7 (sexto subcultivo). P8: pase 8 (séptimo subcultivo). P9: pase 9 (octavo subcultivo). Se señalan en amarillo los valores de significación p que resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Potasio – Estadísticos de contraste (a)

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
P1-P2	-4,029269172	0,00006
P2-P3	-0,966385639	0,33385
P3-P4	-3,68530717	0,00023
P4-P5	-1,393391438	0,16350
P5-P6	-2,047392872	0,04062
P6-P7	-4,12754403	0,00004
P7-P8	-4,848226321	0,00000
P8-P9	-4,12754403	0,00004

a. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Tabla 26. Análisis estadístico para la comparación de las concentraciones medias de calcio en dos pases celulares consecutivos utilizando la prueba estadística de Wilcoxon. P1: pase1 (primocultivo). P2: pase 2 (primer subcultivo). P3: pase 3 (segundo subcultivo). P4: pase 4 (tercer subcultivo). P5: pase 5 (cuarto subcultivo). P6: pase 6 (quinto subcultivo). P7: pase 7 (sexto subcultivo). P8: pase 8 (séptimo subcultivo). P9: pase 9 (octavo subcultivo). Se señalan en amarillo los valores de significación p que resultaron estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Calcio – Estadísticos de contraste (a)

	Z	Sig. asintót. (bilateral)
P1-P2	-0,008550757	0,99318
P2-P3	-2,052256764	0,04014
P3-P4	-0,062552382	0,95012
P4-P5	-2,994295661	0,00275
P5-P6	-0,092569766	0,92625
P6-P7	-0,355672071	0,72209
P7-P8	-0,159524091	0,87326
P8-P9	-2,366109894	0,01798

a. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

5. VIABILIDAD MEDIA (VM)

La Viabilidad Media (VM) se calculó a partir de los datos de viabilidad celular obtenidos mediante Live/Dead[®], azul tripán y microanálisis. Como se puede apreciar en la Tabla 27 y en la Figura 43, el índice de Viabilidad Media sugiere que la máxima viabilidad celular corresponde al pase 6, encontrándose la menor viabilidad en el pase 9.

Tabla 27. Tabla representativa de las medias de viabilidad celular obtenidas mediante los distintos ensayos de viabilidad celular utilizados en esta Tesis Doctoral, técnica Live/Dead[®], técnica de azul tripán y microanálisis, en todos los pases celulares de condrocitos de disco articular de la ATM del adulto humano. También se presenta la Viabilidad Media (media de todas las medias obtenidas).

	K/Na	Live/Dead	Azul tripán	Viabilidad Media
P1	0,07633742	-1,23628998	0,03720412	-0,37424948
P2	-1,47284443	-1,87732639	0,62662105	-0,90784992
P3	-0,45920813	0,36512502	-0,65918386	-0,25108899
P4	0,08184613	0,22210753	-1,314408	-0,33681811
P5	0,7117135	0,71785183	0,87999887	0,76985473
P6	1,44906512	0,90483792	1,30179324	1,21856543
P7	0,38355181	1,1439422	0,65326881	0,72692094
P8	0,74549644	0,09560545	0,06942413	0,30350867
P9	-1,51595786	-0,33585357	-1,59471836	-1,14884326

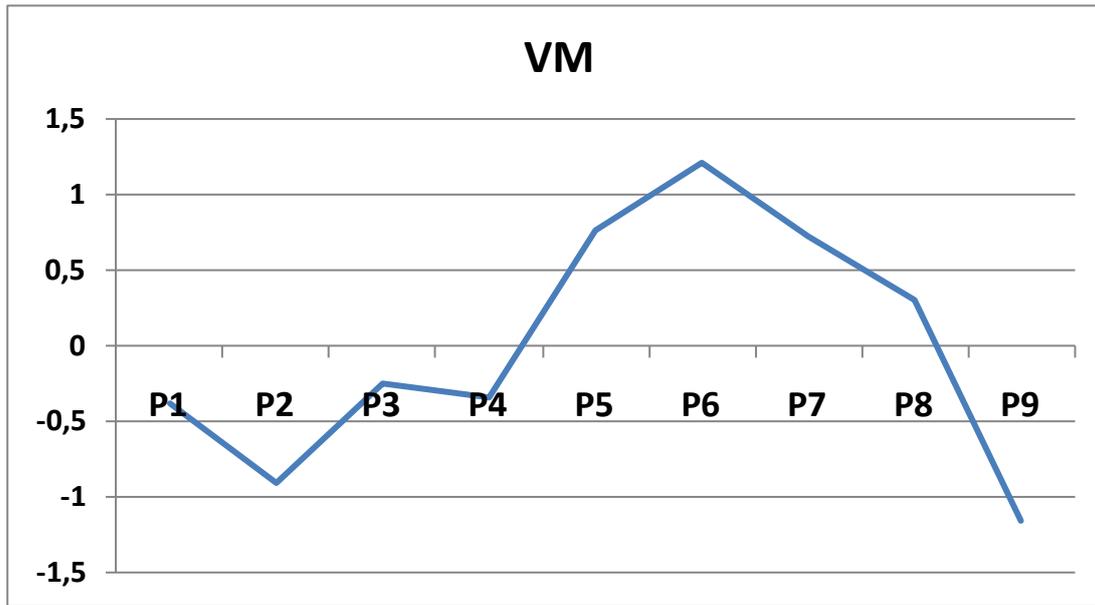


Figura 43. Representación gráfica de la Viabilidad Media en los distintos pases celulares, donde se puede observar que el mayor índice de viabilidad celular se encuentra en el pase seis y el menor en el pase nueve.

6. VIABILIDAD CELULAR DETERMINADA MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL UTILIZANDO MICROARRAY DE ARN

Partiendo de los índices de Viabilidad Media, se identificaron aquellos genes/EST que tuvieran la misma tendencia que la Viabilidad Media mediante un análisis de correlación significativa positiva ($r > 0,7$) o negativa ($r < -0,7$).

- Análisis no supervisado. El análisis reveló la existencia de 1.937 genes/EST con correlación significativa positiva con la Viabilidad Media ($r > 0,7$) y 632 genes/EST con correlación significativa negativa con la Viabilidad Media ($r < -0,7$). El análisis de las funciones de todos estos genes utilizando los programas Cytoscape-BiNGO se muestra en las Tablas 28 y 29.
- Análisis supervisado. En este análisis sólo se estudiaron aquellos genes cuyo papel estaba relacionado con la viabilidad celular o con apoptosis (371 genes en el *array*). De este análisis se obtuvieron 15 genes que presentaban correlación significativa positiva con la Viabilidad Media ($r > 0,7$) (Tabla 30), y 13 con correlación significativa negativa con la Viabilidad Media ($r < -0,7$) (Tabla 31). El análisis de las funciones se ha realizado con el mismo programa que en el análisis no supervisado. Este análisis está representado en las Tablas 32 y 33.

Tabla 28. Tabla donde se especifican las funciones génicas de los genes con correlación significativa positiva con la Viabilidad Media, $r > 0,7$, dentro del análisis no supervisado. Se ha llevado a cabo con el programa Cytoscape-BINGO.

Referencia Gene Ontology	Valor estadístico p	Valor estadístico p corregido	Funciones génicas
43231	1,87E-08	2,50E-05	intracellular membrane-bound organelle
43227	2,01E-08	2,50E-05	membrane-bound organelle
48523	5,08E-07	4,20E-04	negative regulation of cellular process
48519	1,19E-06	7,20E-04	negative regulation of biological process
43118	1,74E-06	7,20E-04	negative regulation of physiological process
51243	1,74E-06	7,20E-04	negative regulation of cellular physiological process
287	2,05E-06	7,26E-04	magnesium ion binding
9892	2,37E-06	7,35E-04	negative regulation of metabolism
43229	4,13E-06	1,05E-03	intracellular organelle
43226	4,21E-06	1,05E-03	organelle
48193	4,81E-06	1,09E-03	golgi vesicle transport
16481	5,68E-06	1,18E-03	negative regulation of transcription
44424	1,28E-05	2,44E-03	intracellular part
5794	1,80E-05	3,02E-03	golgi apparatus
44431	1,91E-05	3,02E-03	golgi apparatus part
45934	1,94E-05	3,02E-03	negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
6888	2,62E-05	3,82E-03	ER to Golgi vesicle-mediated transport
31324	3,35E-05	4,61E-03	negative regulation of cellular metabolism
31090	5,73E-05	7,28E-03	organelle membrane
5622	6,03E-05	7,28E-03	intracellular
8151	6,16E-05	7,28E-03	cellular physiological process
16192	6,53E-05	7,36E-03	vesicle-mediated transport
12505	7,59E-05	8,19E-03	endomembrane system
19899	8,97E-05	9,28E-03	enzyme binding
139	9,67E-05	9,60E-03	golgi membrane
15031	1,02E-04	9,77E-03	protein transport
16879	1,22E-04	1,12E-02	ligase activity,

			forming carbón-nitrogen bonds
6464	1,45E-04	1,29E-02	protein modification
45184	1,87E-04	1,60E-02	establishment of protein localization
45892	2,17E-04	1,80E-02	negative regulation of transcription, DNA-dependent
4842	2,29E-04	1,80E-02	ubiquitin-protein ligase activity
43412	2,32E-04	1,80E-02	biopolymer modification
44238	2,69E-04	2,03E-02	primary metabolism
4437	2,79E-04	2,04E-02	inositol or phosphatidylinositol phosphatase activity
50794	3,04E-04	2,16E-02	regulation of cellular process
50684	3,30E-04	2,23E-02	regulation of mRNA processing
5798	3,33E-04	2,23E-02	golgi-associated vesicle
44444	3,43E-04	2,24E-02	cytoplasmic part
E activity5737	3,73E-04	2,37E-02	cytoplasmic
8104	3,81E-04	2,37E-02	protein localization
16302	4,45E-04	2,69E-02	phosphoric monoester hydrolase activity
5515	5,25E-04	3,10E-02	protein binding
51252	5,42E-04	3,13E-02	regulation of RNA metabolism
4017	6,30E-04	3,49E-02	adenylate kinase activity
51325	6,33E-04	3,49E-02	interphase
40007	6,69E-04	3,61E-02	growth
31575	7,25E-04	3,83E-02	G1/S transition checkpoint
3824	8,57E-04	4,43E-02	catalytic activity
82	9,14E-04	4,63E-02	G1/S transition of mitotic cell cycle
16740	9,95E-04	4,94E-02	transferase activity

Tabla 29. Tabla donde se especifican las funciones génicas de los genes con correlación significativa negativa con la Viabilidad Media, $r < -0,7$, dentro del análisis no supervisado. Se ha llevado a cabo con el programa Cytoscape-BINGO.

Referencia Gene Ontology	Valor estadístico p	Valor estadístico p corregido	Funciones génicas
5515	7,06E-16	1,91E-12	protein binding
7275	2,53E-08	3,42E-05	development
5623	1,18E-07	1,07E-04	cell
44464	1,71E-07	1,16E-04	cell part

7155	2,46E-07	1,33E-04	cell adhesion
5575	3,18E-07	1,43E-04	cellular_component
7167	1,78E-06	6,89E-04	enzyme linked receptor protein signaling pathway
5488	7,47E-06	2,53E-03	binding
5001	1,36E-05	3,69E-03	transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase activity
19198	1,36E-05	3,69E-03	transmembrane receptor protein phosphatase activity
7185	2,31E-05	5,29E-03	transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway
4714	2,35E-05	5,29E-03	transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity
31226	3,27E-05	6,82E-03	intrinsic to plasma membrane
5887	3,62E-05	7,00E-03	integral to plasma membrane
30532	5,73E-05	1,03E-02	small nuclear ribonucleoprotein complex
19199	6,51E-05	1,10E-02	transmembrane receptor protein kinase activity
7169	8,15E-05	1,30E-02	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway
30154	9,14E-05	1,38E-02	cell differentiation
5886	1,41E-04	1,96E-02	plasma membrane
16787	1,45E-04	1,96E-02	hydrolase activity
16020	2,12E-04	2,73E-02	membrane
46982	2,72E-04	3,08E-02	protein heterodimerization activity
48513	2,81E-04	3,08E-02	organ development
8559	2,86E-04	3,08E-02	xenobiotic- transporting ATPase activity
42910	2,86E-04	3,08E-02	xenobiotic transporter activity
9987	3,05E-04	3,08E-02	cellular process
44459	3,07E-04	3,08E-02	plasma membrane part
43566	4,01E-04	3,77E-02	structure-specific DNA binding
7399	4,04E-04	3,77E-02	nervous system development
48731	4,93E-04	4,45E-02	system development

Tabla 30. Genes con correlación significativa positiva con la Viabilidad Media, $r > 0,7$ dentro del análisis supervisado.

Referencia Affymetrix	Correlación con Viabilidad Media	Símbolo del gen	Nombre del gen
206814_at	0,90217	NGF	nerve growth factor (beta polypeptide)
203275_at	0,84940	IRF2	interferon regulatory factor 2
212594_at	0,84411	PDCD4	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)
215028_at	0,82797	SEMA6A	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A
202431_s_at	0,82762	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
210654_at	0,81566	TNFRSF10D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain
210164_at	0,79229	GZMB	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)
211704_s_at	0,79067	SPIN2A /// SPIN2B	spindlin family, member 2A /// spindlin family, member 2B
220048_at	0,78660	EDAR	ectodysplasin A receptor
210405_x_at	0,78444	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
211832_s_at	0,78062	MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)
206706_at	0,75119	NTF3	neurotrophin 3
210538_s_at	0,74558	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3
227816_at	0,72509	NTN1	netrin 1
232210_at	0,72017	---	---

Tabla 31. Genes con correlación significativa negativa con la Viabilidad Media, $r < -0,7$ dentro del análisis supervisado.

Referencia Affymetrix	Correlación con Viabilidad Media	Símbolo del gen	Nombre del gen
205641_s_at	-0,70783	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
223449_at	-0,71040	SEMA6A	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A
215346_at	-0,71703	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
218573_at	-0,72289	MAGEH1	melanoma antigen family H, 1
220403_s_at	-0,73693	P53AIP1	p53-regulated apoptosis-inducing protein 1
209833_at	-0,74365	CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
235642_at	-0,75102	---	---
207181_s_at	-0,75857	CASP7	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
219350_s_at	-0,77603	DIABLO	diablo homolog (Drosophila)
210907_s_at	-0,80729	PDCD10	programmed cell death 10
223851_s_at	-0,80899	TNFRSF18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18
201746_at	-0,83686	TP53	tumor protein p53
201086_x_at	-0,87303	SON	SON DNA binding protein

Tabla 32. Tabla donde se especifican las funciones génicas de los genes con correlación significativa positiva con la Viabilidad Media, $r > 0,7$, dentro del análisis supervisado. Se ha llevado a cabo con el programa Cytoscape-BINGO.

Referencia Gene Ontology	Valor estadístico p	Valor estadístico p corregido	Funciones génicas
6915	1,06E-11	1,17E-09	apoptosis
12501	1,10E-11	1,17E-09	programmed cell death
8219	1,73E-11	1,17E-09	cell death
16265	1,84E-11	1,17E-09	death
51243	1,25E-07	6,40E-06	negative regulation of cellular physiological process
43118	1,64E-07	6,95E-06	negative regulation of physiological process
48523	2,46E-07	8,95E-06	negative regulation of cellular process
48519	4,08E-07	1,30E-05	negative regulation of biological process
42981	1,03E-04	2,43E-03	regulation of apoptosis
6916	1,04E-04	2,43E-03	anti-apoptosis
43067	1,05E-04	2,43E-03	regulation of programmed cell death
43066	1,53E-04	3,06E-03	negative regulation of apoptosis
43069	1,56E-04	3,06E-03	negative regulation of programmed cell death
16481	2,48E-04	4,52E-03	negative regulation of transcription
45934	3,03E-04	5,15E-03	negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
31324	4,59E-04	7,31E-03	negative regulation of cellular metabolism
51244	5,24E-04	7,63E-03	regulation of cellular physiological process
6928	6,04E-04	7,63E-03	cell motility
40011	6,04E-04	7,63E-03	locomotion
51674	6,04E-04	7,63E-03	localization of cell
50791	6,66E-04	7,63E-03	regulation of physiological process
8632	6,92E-04	7,63E-03	apoptotic program
9892	7,33E-04	7,63E-03	negative regulation of metabolism
4278	7,48E-04	7,63E-03	granzyme B activity
17163	7,48E-04	7,63E-03	negative regulator of basal transcription activity
50794	8,72E-04	8,48E-03	regulation of cellular process
6357	8,98E-04	8,48E-03	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
122	1,20E-03	1,10E-02	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
50789	1,40E-03	1,16E-02	regulation of biological process
43508	1,50E-03	1,16E-02	negative regulation of JNK activity
45569	1,50E-03	1,16E-02	TRAIL binding
6923	1,50E-03	1,16E-02	cleavage of cytoskeletal proteins
6922	1,50E-03	1,16E-02	cleavage of lamin
8151	2,85E-03	2,14E-02	cellular physiological process

45892	3,05E-03	2,22E-02	negative regulation of transcription, DNA-dependent
7569	3,74E-03	2,49E-02	cell aging
74	4,05E-03	2,49E-02	regulation of progression through cell cycle
7399	4,05E-03	2,49E-02	nervous system development
45859	4,08E-03	2,49E-02	regulation of protein kinase activity
43549	4,08E-03	2,49E-02	regulation of kinase activity
48731	4,15E-03	2,49E-02	system development
51726	4,15E-03	2,49E-02	regulation of cell cycle
51338	4,20E-03	2,49E-02	regulation of transferase activity
6366	4,38E-03	2,54E-02	transcription from RNA polymerase II promoter
51242	4,52E-03	2,56E-02	positive regulation of cellular physiological process
7154	4,71E-03	2,61E-02	cell communication
43119	5,13E-03	2,78E-02	positive regulation of physiological process
45946	5,23E-03	2,78E-02	positive regulation of translation
8283	6,12E-03	3,19E-02	cell proliferation
45786	6,34E-03	3,23E-02	negative regulation of progression through cell cycle
16280	6,72E-03	3,34E-02	aging
5515	6,83E-03	3,34E-02	protein binding
7275	7,08E-03	3,34E-02	development
48522	7,14E-03	3,34E-02	positive regulation of cellular process
6921	7,46E-03	3,34E-02	disassembly of cell structures during apoptosis
30424	7,46E-03	3,34E-02	axon
42176	7,46E-03	3,34E-02	regulation of protein catabolism
7250	8,20E-03	3,55E-02	activation of NF-kappaB-inducing kinase
8625	8,20E-03	3,55E-02	induction of apoptosis via death domain receptors
8656	9,69E-03	4,12E-02	caspase activator activity
48518	1,09E-02	4,38E-02	positive regulation of biological process
51246	1,10E-02	4,38E-02	regulation of protein metabolism
9894	1,12E-02	4,38E-02	regulation of catabolism
5626	1,12E-02	4,38E-02	insoluble fraction
16505	1,12E-02	4,38E-02	apoptotic protease activator activity
43506	1,19E-02	4,53E-02	regulation of JNK activity
16504	1,19E-02	4,53E-02	protease activator activity
19835	1,27E-02	4,74E-02	cytolysis
43407	1,34E-02	4,95E-02	negative regulation of MAPK activity
7049	1,40E-02	4,96E-02	cell cycle
7582	1,41E-02	4,96E-02	physiological process
43028	1,41E-02	4,96E-02	caspase regulator activity
50790	1,42E-02	4,96E-02	regulation of enzyme activity
6915	1,06E-11	1,17E-09	apoptosis
12501	1,10E-11	1,17E-09	programmed cell death
8219	1,73E-11	1,17E-09	cell death
16265	1,84E-11	1,17E-09	death

51243	1,25E-07	6,40E-06	negative regulation of cellular physiological process
-------	----------	----------	---

Tabla 33. Tabla donde se especifican las funciones génicas de los genes con correlación significativa negativa con la Viabilidad Media, $r < -0,7$, dentro del análisis supervisado. Se ha llevado a cabo con el programa Cytoscape-BINGO.

Referencia Gene Ontology	Valor estadístico p	Valor estadístico p corregido	Funciones génicas
6915	5,83E-17	7,34E-15	apoptosis
12501	6,07E-17	7,34E-15	programmed cell death
8219	1,06E-16	7,34E-15	cell death
16265	1,15E-16	7,34E-15	death
42981	4,82E-08	2,13E-06	regulation of apoptosis
43067	4,99E-08	2,13E-06	regulation of programmed cell death
6917	2,24E-06	7,18E-05	induction of apoptosis
12502	2,24E-06	7,18E-05	induction of programmed cell death
43065	3,54E-06	9,27E-05	positive regulation of apoptosis
43068	3,62E-06	9,27E-05	positive regulation of programmed cell death
8635	4,27E-06	9,94E-05	caspase activation via cytochrome c
8632	5,52E-06	1,18E-04	apoptotic program
48522	1,88E-05	3,70E-04	positive regulation of cellular process
8625	2,34E-05	4,29E-04	induction of apoptosis via death domain receptors
48518	3,94E-05	6,72E-04	positive regulation of biological process
30693	8,07E-05	1,29E-03	caspase activity
6919	1,38E-04	2,07E-03	caspase activation
43280	1,72E-04	2,44E-03	positive regulation of caspase activity
51345	1,97E-04	2,44E-03	positive regulation of hydrolase activity
8624	1,97E-04	2,44E-03	induction of apoptosis by extracellular signals
51242	2,04E-04	2,44E-03	positive regulation of cellular physiological process
43281	2,10E-04	2,44E-03	regulation of caspase activity
43119	2,43E-04	2,71E-03	positive regulation of physiological process
8369	3,29E-04	3,51E-03	obsolete molecular function
51097	6,86E-04	6,50E-03	negative regulation of helicase activity
51095	6,86E-04	6,50E-03	regulation of helicase activity
739	6,86E-04	6,50E-03	DNA strand annealing activity
43123	1,22E-03	1,10E-02	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
51336	1,25E-03	1,10E-02	regulation of hydrolase activity
46902	1,37E-03	1,17E-02	regulation of mitochondrial

			membrane permeability
43122	1,45E-03	1,19E-02	regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
9967	1,96E-03	1,57E-02	positive regulation of signal transduction
42771	2,06E-03	1,60E-02	DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in induction of apoptosis
43085	2,60E-03	1,95E-02	positive regulation of enzyme activity
7249	2,69E-03	1,97E-02	I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
50794	2,79E-03	1,98E-02	regulation of cellular process
5515	3,04E-03	2,10E-02	protein binding
6916	3,32E-03	2,23E-02	anti-apoptosis
7569	3,43E-03	2,25E-02	cell aging
50789	4,19E-03	2,65E-02	regulation of biological process
43066	4,29E-03	2,65E-02	negative regulation of apoptosis
43069	4,35E-03	2,65E-02	negative regulation of programmed cell death
8151	4,65E-03	2,77E-02	cellular physiological process
47485	4,79E-03	2,79E-02	protein N-terminus binding
5031	5,48E-03	3,11E-02	tumor necrosis factor receptor activity
16280	6,16E-03	3,22E-02	aging
5035	6,16E-03	3,22E-02	death receptor activity
42114	6,16E-03	3,22E-02	B cell proliferation
43120	6,16E-03	3,22E-02	tumor necrosis factor binding
6976	6,84E-03	3,37E-02	DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator
30424	6,84E-03	3,37E-02	axon
8630	6,84E-03	3,37E-02	DNA damage response, signal transduction resulting in induction of apoptosis
16363	7,52E-03	3,57E-02	nuclear matrix
51262	7,52E-03	3,57E-02	protein tetramerization
5739	7,93E-03	3,65E-02	mitochondrion
19899	7,98E-03	3,65E-02	enzyme binding
51243	8,86E-03	3,92E-02	negative regulation of cellular physiological process
7006	8,88E-03	3,92E-02	mitochondrial membrane organization and biogenesis
43118	9,86E-03	4,28E-02	negative regulation of physiological process
5626	1,02E-02	4,37E-02	insoluble fraction
51244	1,09E-02	4,51E-02	regulation of cellular physiological process
30168	1,09E-02	4,51E-02	platelet activation
48523	1,16E-02	4,72E-02	negative regulation of cellular process
50790	1,19E-02	4,78E-02	regulation of enzyme activity
50791	1,28E-02	4,95E-02	regulation of physiological process
7148	1,29E-02	4,95E-02	cellular morphogenesis
6839	1,30E-02	4,95E-02	mitochondrial transport

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

El principal objetivo de la Ingeniería Tisular es la construcción de tejidos biológicos artificiales y su utilización terapéutica para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos (Campos; 2004). Las estructuras del aparato locomotor, especialmente el hueso y el cartílago, han sido objeto de especial interés en este campo, dada la incidencia de patologías vinculadas a los tejidos que conforman las distintas unidades anatómicas de dicho aparato.

En relación al cartílago articular, es importante resaltar su limitada capacidad de regeneración y reparación (Redman *et al.*; 2005). De acuerdo con esto, son dos los objetivos de cualquier terapéutica sustitutiva de este tipo de tejido: por un lado, la sustitución del defecto cartilaginoso por un nuevo tejido y, por otro, la integración del nuevo tejido con el tejido nativo existente. La carencia de vascularización en el tejido cartilaginoso dificulta cualquier proceso reparativo e impide, a diferencia de otras estructuras corporales, la regeneración mediada por células madre que son vehiculadas por el torrente circulatorio (Hicks *et al.*; 2006).

La Ingeniería Tisular aplicada al tejido cartilaginoso, debido a la elevada prevalencia de la patología degenerativa articular, se ha establecido en el momento presente como una de las herramientas más prometedoras a la hora de paliar algunas de las deficiencias antes comentadas (Tuli *et al.*; 2003). Hasta la actualidad, se han venido desarrollando diferentes modelos para la formación de nuevo tejido cartilaginoso, los cuales van desde la terapia celular con condrocitos aislados hasta la elaboración de constructos cartilagosos tridimensionales que incorporan células cartilaginosas a distintos biomateriales, añadiéndose, en algunos protocolos, distintos factores de crecimiento (por ejemplo, el factor de crecimiento transformante beta o TGF- β) (Tuli *et al.*; 2003), (Steinert *et al.*; 2007). La terapia celular y los distintos constructos de cartílago han generado resultados muy diversos, habiéndose descrito, entre los problemas más significativos, la insuficiente diferenciación celular, la pérdida del número de células implantadas, la degeneración de las matrices utilizadas como biomateriales y la falta de integración del nuevo tejido en el sujeto que lo recibe (Steinert *et al.*; 2007). En este contexto, Goldstein (Goldstein; 1992) afirma que el éxito de cualquier protocolo de Ingeniería Tisular exige una adecuada combinación de cuatro factores: células y factores de crecimiento, biomateriales y, por último, condiciones ambientales.

Hasta el momento, existen una gran número de estudios sobre la Ingeniería Tisular del cartílago articular de la rodilla, siendo bastante más limitados los referentes al estudio del disco articular de la ATM, tema de estudio de la presente Tesis Doctoral.

Como se desarrolló en la parte introductoria de este trabajo de investigación, el disco articular de la ATM es un tejido fibrocartilaginoso localizado entre el cóndilo mandibular y la eminencia articular del hueso temporal (fosa glenoidea). Principalmente, este tejido tiene la función de disminuir el roce de las superficies articulares de la ATM durante el movimiento. Además, es el responsable de neutralizar la presión intraarticular, distribuir las cargas y disminuir la incongruencia entre las estructuras articulares. La patología de la ATM, es decir, el Síndrome de Disfunción Temporomandibular, presenta una prevalencia muy elevada y una presión sanitaria muy importante. La etiología del Síndrome de Disfunción Temporomandibular es multifactorial y muy compleja; sin embargo, factores como la luxación, malformación o degeneración del disco articular podrían estar asociados a esta patología (Farrar y McCarty; 1979), (Wilkes; 1989). Desafortunadamente, las opciones de tratamiento para los pacientes con un Síndrome de Disfunción Temporomandibular son escasas y con mal pronóstico. Las primeras medidas terapéuticas están dirigidas a controlar la progresión de la patología, ya que la curación de la misma es prácticamente imposible. Cuando la degeneración articular es muy avanzada, el paciente es subsidiario de un tratamiento quirúrgico. Inicialmente, se realiza un tratamiento mínimamente invasivo mediante cirugía artroscópica. En los últimos estadios, donde el daño articular es muy severo y, debido a la naturaleza avascular del disco articular, es poco probable encontrar una reparación natural del mismo, es necesario realizar una cirugía abierta que implica extirpación del disco articular (discectomía) y, en determinadas ocasiones, resección y reconstrucción del complejo temporomandibular mediante injertos osteocartilaginosos o mediante prótesis articulares.

En distintos estudios se ha demostrado que la evolución de esta patología no es siempre satisfactoria tras una discectomía y, en determinadas ocasiones, los resultados encontrados son más satisfactorios en los casos en los que se realiza una reparación discal en vez de una discectomía (Dolwick; 1983), (Dolwick; 2001). La eficacia de la sustitución articular también es dudosa. Todo ello nos lleva a intentar buscar un procedimiento terapéutico que promueva el mecanismo de reparación discal natural y evitar así la extirpación del disco, es decir, reemplazar la zona discal dañada por disco nativo equivalente. De aquí surge el importante papel de la Ingeniería Tisular del disco articular como arma terapéutica en el Síndrome de Disfunción Temporomandibular con degeneración severa discal. La elaboración de constructos de discos articulares constituye, por tanto, un objetivo básico de la Ingeniería Tisular en este área.

Para el desarrollo de un implante viable mediante Ingeniería Tisular es necesario conocer y entender previamente la composición del tejido nativo y cómo éste funciona. Los estudios existentes acerca del disco articular de la ATM son escasos cuando se comparan con otros tejidos articulares cartilagosos, como la rodilla, donde los estudios de caracterización y de Ingeniería Tisular sobrepasan enormemente a los del disco articular. Aún así, cada vez se está investigando más sobre la ATM. Podemos citar algunos artículos de investigación de importante relevancia en cuanto a la caracterización del disco articular de la ATM: Detamore y Athanasiou (Detamore y Athanasiou; 2003), (Detamore y Athanasiou; 2003), quienes realizan un estudio de caracterización del disco articular y destacan la importancia de la Ingeniería Tisular en el área de la ATM; Almarza y Athanasiou (Almarza y Athanasiou; 2004) comparan las características del disco articular de la ATM con otros tejidos cartilagosos mejor estudiados, como el de la rodilla; Johns y Athanasiou (Johns y Athanasiou; 2007) desarrollan un estudio similar.

Los principales estudios de investigación de Ingeniería Tisular del disco articular de la ATM han sido desarrollados en la introducción de esta Tesis Doctoral. Todos ellos se centran en el estudio de los pilares básicos en los que se sustenta la Ingeniería Tisular, es decir, en la selección del biomaterial adecuado, en la identificación de las fuentes celulares y en la clasificación de los estímulos biológicos (factores de crecimiento) y estímulos biomecánicos (biorreactores) (Thomas *et al.*; 1991), (Puelacher *et al.*; 1994), (Girdler; 1995), (Girdler; 1998), (Springer *et al.*; 2001), (Poshusta y Anseth; 2001), (Almarza y Athanasiou; 2004), (Detamore y Athanasiou; 2004), (Detamore y Athanasiou; 2005), (Almarza y Athanasiou; 2005), (Detamore y Athanasiou; 2005), (Almarza y Athanasiou; 2006), (Bean *et al.*; 2006), (Almarza y Athanasiou; 2006) (Allen y Athanasiou; 2007), (Johns y Athanasiou; 2007), (Allen y Athanasiou; 2008), (Johns, Wong y Athanasiou; 2008), (Anderson y Athanasiou; 2009), (Mäenpää *et al.*; 2010), (Su y Kang; 2010), (Kalpakci, Kim y Athanasiou; 2011), (Kang *et al.*; 2011).

La célula, en nuestro caso el condrocito, objetivo de estudio en la presente Tesis Doctoral es, en lo que a su actividad funcional se refiere, un elemento esencial para el éxito de cualquier protocolo de Ingeniería Tisular que tenga por objeto la fabricación de tejido cartilaginoso con destino a la terapéutica. Para ello, es necesario asegurar que las células utilizadas para este fin sean *capaces de sobrevivir* y mantener niveles adecuados de actividad mecánica y metabólica similares a los que existen en el cartílago ortotípico (Gorti *et al.*; 2003). De este modo, sería posible predecir la mayor o

menor integración de una población celular determinada, una vez implantada *in vivo*. En este sentido, uno de los factores decisivos en el éxito de la Terapia Celular y Tissular es la viabilidad de las células utilizadas en los distintos protocolos. A este respecto, diferentes autores, utilizando técnicas clásicas de evaluación de la viabilidad celular, han demostrado que las células mantenidas en cultivo tienden a envejecer y perder viabilidad después de varios pases celulares (Balconi y Dejana; 1986), (Zhu y Joyce; 2004), (Alaminos *et al.*; 2007b), (Rodríguez-Morata *et al.*; 2008), (Rosales; 2008), (Garzón *et al.*; 2012). En la actualidad, existe gran heterogeneidad en lo que se refiere a la viabilidad de las células utilizadas en los diversos estudios de investigación (Alaminos *et al.*; 2007b), (Rodríguez-Morata *et al.*; 2008), (Montalvo; 2008a), existiendo pocos estudios relativos a la evaluación de la viabilidad de las células del cartílago y, menor aún, referente a los condrocitos del disco articular de la ATM.

Como se desarrolló en el apartado Materiales y Métodos de la presente Tesis Doctoral, los condrocitos se obtuvieron a partir de biopsias de disco articular de la ATM de adulto humano en pacientes sometidos a extirpación del disco articular (discectomía). Tras la digestión de las biopsias en una solución de colagenasa, se consiguieron aislar eficazmente los condrocitos del disco articular. La aplicación de la metodología expuesta en el apartado correspondiente de esta Tesis Doctoral permitió obtener de manera rápida y sencilla cultivos celulares de condrocitos humanos útiles para la investigación y la terapéutica. Disponer de cultivos de estas células permitirá en el futuro realizar estudios fisiológicos, genéticos y bioquímicos sobre estas células para un mejor conocimiento de las mismas.

Una vez obtenidos los cultivos celulares, procedimos al estudio de la viabilidad celular de los mismos. Para ello hemos utilizado, en primer lugar, las *técnicas mixtas metabólicas y de exclusión de colorantes vitales (Live/Dead®)* y las *técnicas de exclusión de colorantes vitales (azul tripán)*. Este tipo de ensayos permite determinar las posibles alteraciones en la integridad de la membrana plasmática en los diferentes pases celulares de los condrocitos del disco articular de la ATM. A continuación, se ha analizado la viabilidad celular mediante la *determinación del perfil iónico cuantitativo mediante microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X* de las células correspondientes a los nueve pases celulares, con objeto de determinar el perfil iónico y el *índice potasio/sodio* de los condrocitos del disco articular. Como se ha demostrado en anteriores estudios, esta técnica de evaluación de la viabilidad celular constituye un excelente indicador de viabilidad (Hongpaisan y Roomans; 1999) (Roomans; 1999 y 2002). Por último, la investigación de la presente Tesis Doctoral se

ha centrado en la realización de una *determinación del perfil de expresión génica global utilizando microarray de ARN* en los distintos pases celulares y centrando la atención en la expresión de genes/EST relacionados con los fenómenos de viabilidad y mortalidad celular presentes en los condrocitos del disco articular.

En lo referente a los métodos basados en la exclusión de colorantes vitales hay que recordar, como comentamos anteriormente, que son éstos ensayos que permiten identificar las posibles alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática de los condrocitos. El proceso de muerte celular programada (apoptosis) se caracteriza, a nivel morfológico, por la sucesión de una serie de signos concretos, como son: las alteraciones de la membrana plasmática, las cuales conllevan la pérdida de contacto con las células vecinas y la adquisición de una forma redondeada; la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear sin que se pierda la envoltura nuclear; la disgregación del núcleo en masas pequeñas de cromatina, con una disminución paralela del volumen citoplasmático secundario a una pérdida de agua y a la condensación de las proteínas, permaneciendo intactos la mayoría de los orgánulos celulares; y, finalmente, la ruptura de la célula en vesículas rodeadas de membrana, llamadas cuerpos apoptóticos, que serán fagocitados por los macrófagos o por células vecinas (Choy *et al.*; 2001).

El método de evaluación de la viabilidad celular **Live/Dead[®]** (ensayo de viabilidad biofuncional mixto basado en sustancias fluorescentes) permite cuantificar la viabilidad celular de los condrocitos en base a la integridad de su membrana plasmática y a su funcionalidad metabólica. En este caso, se emplean dos sustancias fluorescentes: *acetometoxi-calceína* y un *compuesto de etidio*. La acetometoxi-calceína nos permite realizar un ensayo metabólico funcional, siendo hidrolizada por acción esterasa en el citoplasma de las células vivas, dando lugar a la calceína, una sustancia que emite una señal fluorescente en el espectro del color verde (494/517 nm). El compuesto de etidio, por otra parte, no penetrará en aquellas células viables, haciéndolo sólo en caso de que la célula tenga una membrana alterada o fragmentada (método de exclusión). Cuando el compuesto de etidio alcanza el núcleo celular, se une a la molécula de ADN, aumentando así su fluorescencia hasta 40 veces y emitiendo una señal en el espectro del rojo (517/617 nm).

Tras llevar a cabo la técnica Live/Dead[®] en todos los cultivos celulares de los condrocitos del disco articular de la ATM del adulto humano, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que existe una variabilidad estadísticamente no significativa en relación con la viabilidad celular. Los datos obtenidos revelan que, de manera no

significativa, las menores tasas de viabilidad se encuentran en los dos primeros pases celulares, siendo el pase dos el que menor viabilidad presenta. A partir de ahí, se mantiene una tendencia creciente hasta el séptimo pase celular, donde encontramos la mayor tasa de viabilidad. Finalmente, se vuelve a invertir la tendencia, decreciendo en los dos últimos pases. Esta menor viabilidad celular en los dos primeros pases celulares se podría deber, posiblemente, a la existencia en el cultivo celular de células altamente diferenciadas que no tienen capacidad de proliferar y, por tanto, su viabilidad sería muy baja. A su vez, hay que sumar la adaptación que las células deben realizar a un nuevo micromedioambiente (cultivo celular), proceso durante el cual un elevado número de células pueden morir.

En consecuencia, el estudio de la viabilidad mediante la técnica de Live/Dead[®] no evidenciaría la necesidad de seleccionar ningún pase celular específico a la hora de diseñar un protocolo de terapia por Ingeniería Tisular, aunque sugiere que las células de los pases seis y siete podrían ser los más viables.

Continuando con la técnica de **azul tripán**, hay que señalar que éste es un colorante orgánico soluble en agua, altamente tóxico, el cual posee grupos cargados amino y sulfato que le impiden atravesar membranas celulares intactas. Debido a ello, el azul tripán tiñe tan sólo las células muertas o con daños groseros en su membrana celular, es decir, aquéllas que se encuentran en una fase avanzada de apoptosis o necrosis, por lo que resulta de interés sólo para calcular el porcentaje de células vivas, pues no identifica aquellas células que se encuentran en un estadio preapoptótico, puesto que durante las primeras fases de la apoptosis la membrana celular se mantiene íntegra (Alaminos *et al.*; 2007). Este método clásico ha de complementarse en la mayoría de los casos con la utilización de métodos más sensibles.

Una vez desarrollada la técnica de azul tripán en los distintos cultivos celulares analizados en la presente Tesis Doctoral, se puso de manifiesto la variabilidad significativa existente en relación con la viabilidad celular en dichos cultivos celulares. Así, podemos observar un aumento de viabilidad entre el primer y segundo pase celular, tendencia que se invierte con un descenso de la viabilidad hasta llegar al cuarto pase, donde vuelve a cambiar y empieza a aumentar la tasa de viabilidad celular. Este ascenso de viabilidad celular se mantiene hasta alcanzar su máxima tasa en el pase seis. A partir de ahí, empieza a descender de forma progresiva hasta alcanzar su menor tasa de viabilidad en el pase nueve.

De los resultados obtenidos podemos inferir, de manera similar a lo comentado para la técnica Live/Dead[®], que los condrocitos del disco articular presentan al inicio un periodo de adaptación al cultivo, en el que un importante número de células no sobrevive a las condiciones del medio. A partir del cuarto pase celular, los condrocitos se recuperan, observándose un incremento de viabilidad hasta alcanzar el nivel más elevado en el sexto pase celular. No obstante, la tasa de viabilidad celular en cultivo primario de los condrocitos del disco articular es alta, aún habiendo sufrido un enérgico procesamiento mecánico y enzimático durante el aislamiento.

Por todo ello, se puede decir que serían recomendables los pases celulares quinto, sexto y séptimo, aunque principalmente el sexto, como posibles agentes terapéuticos en protocolos de Terapia Celular e Ingeniería Tisular, siendo éstos los pases con viabilidad significativamente mayor.

Continuando con el estudio de viabilidad celular de los condrocitos del disco articular de la ATM del adulto humano, el tercer método utilizado para este propósito fue la **microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X**, la cual permitió analizar *in situ* la composición química de las células, al mismo tiempo que su observación microscópica, de tal manera que se pudo correlacionar la información estructural con el contenido elemental (Warley; 1990 y 1994), (Fernández-Segura y Warley; 2008). Con esta técnica se pudo conocer el perfil iónico de los diferentes pases celulares del disco articular de la ATM del adulto humano y, por tanto, contribuir a una mayor caracterización de la biología celular en cada uno de ellos.

Como se desarrolló en el apartado Resultados, el análisis estadístico de los valores de las distintas concentraciones iónicas en los diferentes pases celulares demostró la existencia de diferencias globales entre los 9 pases celulares analizados para sodio, magnesio, fósforo, azufre, cloro, potasio y calcio. Sin embargo, cuando se realizó una comparación por pares de pases consecutivos utilizando la prueba de Wilcoxon, se pudo detectar la presencia de diferencias significativas para todos los elementos, aunque únicamente para pases celulares específicos.

A continuación, se describen los resultados obtenidos para cada elemento en su evolución a lo largo de cada uno de los pases celulares y la interpretación de su significado en relación con la viabilidad celular:

- El primer elemento analizado fue el *ión fósforo*. El fósforo experimentó cambios estadísticamente significativos en todos los pases celulares, excepto entre los pases segundo y tercero. Presenta alternancia de aumento y descenso en sus

niveles en cada pase, encontrándose el mayor nivel en el pase octavo, y los menores niveles en los pases segundo, tercero y séptimo. Desde el punto de vista microanalítico, el fósforo es un elemento que se relaciona con la masa celular analizada, la concentración de constituyentes orgánicos intracelulares, el contenido en ácidos nucleicos y el nivel de fosforilación celular. Roomans (Roomans; 2002b) indica que la concentración de este elemento permanece constante en células que no muestran un daño estructural. Por el contrario, las células caracterizadas por un daño estructural grave presentan una disminución en la concentración intracelular de fósforo. Por tanto, la disminución existente en el pase segundo, tercero y séptimo indican una posible disminución de la viabilidad celular del cultivo en esos pases, con posible daño estructural de dichas células.

- Otro elemento analizado fue el *magnesio*, cuyos resultados obtenidos fueron semejantes a los del fósforo, con cambios estadísticamente significativos en todos los pases excepto entre los pases uno y dos, dos y tres y cinco y seis. El magnesio ha sido relacionado con los niveles de ATP celulares, de tal forma que un descenso en la concentración elemental de magnesio se correlaciona con un descenso en la concentración de ATP celular (Buja *et al.*; 1985), (Di Francesco *et al.*; 1998), pero también se ha relacionado con la fosforilación y la replicación del ADN. Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral podrían sugerir que las células del disco articular de la ATM del adulto humano experimentarían una disminución de los contenidos de ATP en algunos pases celulares.
- El siguiente elemento a analizar es el *azufre*. Los niveles de concentración del azufre presentan cambios alternantes, encontrando los mayores niveles en los pases uno, cuatro y seis. En todos los pases los cambios fueron estadísticamente significativos, con excepción de los pases ocho y nueve. Estos resultados hay que correlacionarlos con la participación del azufre en el metabolismo de las proteínas sulfatadas, proteoglucanos y glucoproteínas existentes en las células (Sánchez-Quevedo *et al.*; 1989), (Roomans; 2002).
- En cuanto al *calcio*, encontramos una concentración más o menos similar en todos los pases celulares, excepto en los pases tres, cuatro y nueve, donde se produce un aumento en los niveles. Los únicos pases con cambios estadísticamente significativos son entre el pase dos y tres, tres y cuatro y ocho y nueve, que corresponde con los pases en los que se produce un aumento en la concentración del calcio. A este respecto, numerosos estudios muestran que la concentración de calcio intracelular puede aumentar en respuesta a un daño

celular (Roomans y Von Euler; 1996) e, incluso, Johnson (Johnson; 1993) demostró previamente que los valores del calcio se pueden modificar en algunos tipos de muerte celular. Cuando una célula se encuentra dañada y entra en apoptosis, no sólo se incrementa la concentración de calcio, sino que también se produce un incremento de la concentración de sodio, acompañado de una disminución en la concentración de cloro, fósforo, magnesio y potasio (Berger *et al.*; 1989), (LoPachin *et al.*; 1993).

- Finalmente, hay que resaltar la importancia de los resultados microanalíticos del *potasio*, *sodio* y *cloro*, puesto que estos elementos constituyen los indicadores más sensibles y fiables de viabilidad celular (Roomans; 2002). Generalmente, cifras intracelulares bajas de potasio y cloro se relacionan con un proceso de apoptosis, los cuales pueden detectarse en los primeros estadios preapoptóticos (Barbiero *et al.*; 1995), (Hughes *et al.*; 1997), mientras que altos niveles intracelulares de potasio son un excelente indicador de viabilidad celular, sobre todo si éstos van acompañados de un descenso de los niveles de sodio intracelular (Roomans; 2002).
- A este respecto, en este estudio se encontró que los niveles *potasio* presentaron cambios significativos en todos los pases excepto entre los pases dos y tres y cuatro y cinco. En el primer pase encontramos un nivel elevado de potasio, el cual desciende hasta el pase tres, donde se invierte y vuelve a incrementarse. En el pase siete desciende, para luego volver a aumentar en el pase ocho, donde vuelve a invertirse.
- Junto a ello, llama la atención los resultados obtenidos para los niveles de *sodio*, donde observamos unos niveles bajos similares en todos los pases celulares, excepto en los pases dos y nueve, donde se produce un aumento importante en su concentración. Todos los cambios son significativos, menos entre los pases cinco y seis. Diferentes autores demostraron que las altas concentraciones intracelulares de sodio se asocian a daños en la bomba de sodio de la membrana celular, lo cual se relaciona en la mayoría de los casos con un proceso reversible o no de muerte celular (Roomans; 2002), (Alaminos *et al.*; 2007b), (Alaminos *et al.*; 2008). En nuestro caso, las elevadas concentraciones de sodio observados en los pases dos y nueve sugerirían una escasa viabilidad de las células correspondientes a dichos pases.
- En cuanto a los datos microanalíticos del *cloro*, los resultados muestran una disminución estadísticamente significativa de su concentración entre los pases celulares dos y tres, a partir de donde aumenta hasta el pase seis (donde encontramos la mayor concentración) y una nueva disminución significativa

entre los pases seis y siete. Dicha disminución, de acuerdo con varios autores (Zierold; 1997), (Alaminos *et al.*; 2007b), constituye uno de los indicadores microanalíticos más sensibles y precoces de muerte celular programada mediante apoptosis. Por tanto, los pases tres y siete podrían estar experimentando un proceso precoz de apoptosis (preapoptosis).

- Finalmente, otro parámetro a tener en cuenta en el estudio de viabilidad celular mediante microscopía electrónica por dispersión de rayos X es la relación K/Na, la cual ha sido considerada un excelente marcador de viabilidad celular (Roomans; 2002). En este trabajo, el índice K/Na experimenta un descenso entre el pase celular uno y dos, aumentando de forma progresiva hasta el pase celular seis, donde encontramos los mayores índices. A partir de ahí, vuelve a descender en el pase siete y a aumentar ligeramente en el ocho. El pase nueve sufre un descenso brusco, llegando a ser el que menores valores presenta.

De acuerdo con todo lo expuesto, podemos afirmar que las células cultivadas del disco articular de la ATM del adulto humano experimentarían un proceso de adaptación inicial a las condiciones de cultivo, con un descenso del índice K/Na y un aumento del cloro en el pase dos. Estos datos sugieren que parte de las células podrían experimentar un proceso de muerte por necrosis debido a las condiciones ambientales desfavorables para las células más diferenciadas. Posteriormente, las células se adaptarían a las nuevas condiciones del cultivo *in vivo*, con un aumento progresivo de viabilidad hasta el pase seis. Los elevados niveles de K/Na y de cloro en el pase seis nos indican que éste es el pase más viable de acuerdo con el microanálisis por energía dispersiva de rayos X.

A continuación, el brusco descenso de cloro observado en el pase siete, junto con el descenso del K/Na, sugieren que un proceso de mortalidad celular por apoptosis podría originarse a partir de este momento, asociado a un fenómeno de senescencia celular, siendo estas células poco recomendables para uso en Ingeniería Tisular y Terapia Celular.

A continuación, una vez determinada la viabilidad celular mediante las técnicas de Live/Dead[®], azul tripán, y microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X, se procedió al cálculo de la **Viabilidad Media**. De este modo, se asoció por primera vez la información obtenida con cada método, incrementando así la potencia y la sensibilidad de cada técnica. Los resultados revelaron un elevado nivel de concordancia en general entre las tres técnicas, concluyendo que la mayor viabilidad celular correspondería a los pases cinco, seis y siete, por lo que concluimos que éstos

son los pases a utilizar preferentemente en terapia celular del fibrocartilago del disco articular de la ATM. Puesto que los valores de cloro experimentaban una alteración en el pase siete, sería recomendable utilizar el pase cinco y seis antes que el siete.

Finalmente, el último método utilizado para el estudio de la viabilidad celular de los condrocitos del disco articular de la ATM del adulto humano fue el **análisis de la expresión génica global mediante microarray de ARN** en los condrocitos de todos los pases celulares. Actualmente, la utilización del *microarray* de ARN constituye una excelente herramienta para identificar aquellos genes que se expresan en las distintas etapas funcionales de la célula como manifestación de la actividad celular. A este respecto, nuestro análisis de expresión génica global nos permitió identificar patrones de expresión génica generales asociados al cultivo celular seriado durante nueve pases celulares.

Así, el análisis de correlación no supervisado entre los niveles de viabilidad determinados mediante el índice de Viabilidad Media y el análisis de expresión génica global mediante *microarray* permitió establecer el perfil genético asociado a los niveles de viabilidad encontrados en condrocitos humanos de la ATM. Todas las funciones de los genes con correlación significativamente positiva con respecto al índice de Viabilidad Media (50 en total) correspondieron a funciones relacionadas con la síntesis de organelas en un 60%, funciones fisiológicas celulares en un 38% y de crecimiento en un 2%. Estas funciones génicas estarían directamente asociadas con aquellos pases celulares con mayor viabilidad (pases 5 y 6) donde las células presentan gran actividad mitótica y de síntesis de proteínas, como resultado de la activación de funciones asociadas a síntesis de organelas. Sin embargo, el número de funciones génicas correlacionadas de manera inversa con la Viabilidad Media (30 en total) fueron principalmente funciones de desarrollo en un 13% y funciones relacionadas con la membrana plasmática en un 87% aproximadamente. Este perfil funcional demostró ser exclusivo en células con bajos niveles de viabilidad. Sin embargo, esta disminución en la viabilidad celular podría representar un aumento en la potencialidad de estos condrocitos de la ATM para diferenciarse y sintetizar proteínas propias de la matriz cartilaginosa.

Por otra parte, el análisis supervisado de genes relacionados con viabilidad o mortalidad celular reveló la existencia de 15 genes relacionados con 78 funciones intrínsecamente asociados a muerte o viabilidad celular los cuales se encontraron positivamente correlacionados con la Viabilidad Media. Al mismo tiempo, 13 genes correspondientes a 67 funciones se encontraron negativamente asociados a la

Viabilidad Media. Estos datos implican un mecanismo de regulación muy complejo y multifactorial que podría ser agente causal o consecuencia de los cambios observados en la viabilidad celular de los condrocitos del disco articular de la ATM del adulto humano.

En el caso de los genes correlacionados positivamente con el índice de Viabilidad Media, destacan los genes MDM2, MYC, BIRC3, TNFRSF10D y TNFRSF10B. De todos ellos, únicamente el gen TNFRSF10B presenta función pro-apoptótica, mientras que los genes MDM2, MYC, BIRC3 y TNFRSF10D ejercen una función protectora ante la mortalidad celular. En primer lugar, el gen MDM2 (Gene Ontology GO: 0070215), (Momand *et al.*; 1992), (De Oca Luna *et al.*; 1996) es considerado un importante regulador negativo del gen p53, cuya función principal está vinculada a la apoptosis y a diversos mecanismos de estrés celular, control del ciclo celular, senescencia y regulación del metabolismo celular. De esta manera, la inactivación de p53 a través de la expresión positiva de MDM2, representa un mecanismo de represión de las funciones relacionadas con muerte celular y, por tanto, de la disminución de la viabilidad celular. La expresión de MDM2 se correlaciona con el aumento de la viabilidad observado en el análisis del índice de Viabilidad Media disminuyendo eventos celulares como la apoptosis, senescencia y muerte celular, y promoviendo, por otra parte, la proliferación celular directamente relacionada con altos índices de viabilidad celular, como previamente describió Momand y colaboradores (Momand *et al.*; 1992). Por otro lado, la expresión del gen MYC, (Gene Ontology GO: 0071943) ha sido relacionada por diversos autores con la proliferación y la transformación celular mediante la activación de genes promotores del crecimiento y por la supresión de los genes que inhiben la proliferación (Lee *et al.*; 1997). Todo ello está directamente relacionado con los altos niveles de viabilidad observados en la presente Tesis Doctoral. Además, la expresión de genes inhibidores de la apoptosis como BIRC3 (Gene Ontology GO: 0006916 y GO: 0042981) (Uren *et al.*; 1996), (Liston *et al.*; 1996) es compatible con una situación fisiológica en la que los niveles de viabilidad celular son elevados y confirma los datos de correlación positiva con los niveles más altos de viabilidad en los cuales destaca la ausencia de procesos de tipo apoptótico o bien relacionados con muerte celular. De acuerdo con esto, BIRC3 podría estar involucrado directamente en el mantenimiento de elevados índices de viabilidad encontrado en las células de cartílago humano provenientes de la articulación temporomandibular. Otro de los genes correlacionados positivamente con los niveles de viabilidad es el gen TNFRSF10D (Gene Ontology GO: 0006916), miembro de la familia del factor de necrosis tumoral TNF y del receptor del ligando citotóxico TRAIL, contiene un dominio

capaz de bloquear la muerte celular y, por lo tanto, es capaz de inhibir mecanismos de apoptosis. Por el contrario, este gen protege frente a la apoptosis mediada por TRAIL (Degli-Esposti *et al.*; 1997), (Marsters *et al.*; 1997) (Pan *et al.*; 1998). Finalmente, el gen TNFRSF10B (Gene Ontology GO: 0006919), el cual está ampliamente relacionado con el proceso de muerte celular programada (apoptosis) a través de la activación de la vía de las caspasas (Walczak *et al.*; 1997). La activación de la cascada de caspasas, constituye un mecanismo de regulación y control interno de la proliferación. TNFRSF10B activa exclusivamente la caspasa-8, una caspasa iniciadora pero no efectora que necesita de la activación de numerosas caspasas iniciadoras (caspasas 1, 4, 5, 9, 10, 11, 12) para desencadenar procesos de apoptosis. De acuerdo con esto, la asociación significativa entre genes relacionados con la apoptosis y la viabilidad de los condrocitos humanos investigados en esta Tesis Doctoral podría explicar los cambios de la viabilidad celular a lo largo de los 9 subcultivos celulares. La acción combinada de los genes inhibidores y reguladores de la apoptosis como es el caso del gen TNFRSF10B podría ser la responsables de los niveles de viabilidad más altos encontrados especialmente en el subcultivo 6.

Por otra parte, se realizó el análisis de aquellos genes cuya correlación fue negativa con respecto al índice de Viabilidad Media, destacando especialmente los genes TRADD, P53AIP1, TP53, CASP7 y PDCD10. En primer lugar, diversos estudios previamente demostraron que el gen TRADD (Gene Ontology GO: 0006915) reduce el reclutamiento de proteínas inhibidoras de la apoptosis (Hsu *et al.*; 1995). Además, su sobreexpresión lleva a respuestas inductoras de apoptosis a través de la vía TNF. De igual manera, la expresión del gen P53AIP1 (Gene Ontology GO: 0006917) (Oda *et al.*; 2000) está relacionada con un mecanismo de inducción apoptótica. Este gen está estrechamente asociado con p53 (Gene Ontology GO: 0006917) ya que induce su expresión y P53AIP1 probablemente desempeñe un papel importante en la mediación de la apoptosis dependiente de p53. Por otro lado, encontramos una correlación negativa de la Viabilidad Media con la expresión de CASP7 (Gene Ontology GO: 0006915), la cual forma parte del grupo de las caspasas efectoras junto con las caspasas 3 y 6. De esta manera, la sobreexpresión de CASP7 reafirma los procesos evidentes de apoptosis que experimentan los condrocitos de aquellos subcultivos identificados con bajos niveles de viabilidad (Burguillos *et al.*; 2011). Sin embargo, el gen PDCD10 (Gene Ontology GO: 0043066 y GO: 0008284) relacionado con muerte celular y apoptosis en determinados tipos celulares, promueve la proliferación celular especialmente en células vasculares. Modula las vías de apoptosis y es importante para la migración celular, formación de la estructura celular y el ensamblaje del

complejo de Golgi (Bergametti *et al.*; 2005). Dicha expresión podría estar relacionada con aquellos subcultivos celulares en los cuales existe una ligera recuperación de los bajos niveles de viabilidad.

Todos los resultados obtenidos del estudio secuencial de los diferentes pases celulares de condrocitos de la ATM sugieren la existencia de un estricto balance entre la expresión de genes antiapoptóticos y genes proapoptóticos que controlan los procesos de proliferación y muerte celular. Los presentes hallazgos coinciden además con el estudio microanalítico, que determina la concentración y el perfil iónico intracelular mediante microscopía por energía dispersiva de rayos X.

En resumen, los hallazgos de la presente Tesis Doctoral sugieren que la determinación de la viabilidad de los condrocitos humanos procedentes del disco articular de la articulación temporomandibular mantenidos en condiciones de cultivo constituye un paso fundamental para su futuro uso en la fabricación de cartílago articular artificial mediante técnicas de Ingeniería Tisular.

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. La aplicación de los métodos y técnicas desarrollados y optimizados en la presente Tesis Doctoral permitió establecer eficazmente cultivos primarios de condrocitos fibrosos humanos a partir de pequeñas muestras de biopsia del disco articular de la articulación temporomandibular humana. Estos cultivos permitieron llevar a cabo ensayos de viabilidad celular durante al menos nueve pases celulares.
2. La evaluación de la viabilidad de los condrocitos fibrosos del disco articular de la ATM durante los 9 primeros pases celulares utilizando técnicas mixtas metabólicas y de exclusión de colorantes vitales (Live/Dead[®]) no reveló la existencia de diferencias significativas entre los pases celulares analizados, aunque sí se apreció una tendencia a una mayor viabilidad celular en los pases seis y siete.
3. La evaluación de la viabilidad de los condrocitos fibrosos del disco articular de la ATM durante los 9 primeros pases celulares utilizando técnicas de exclusión de colorantes vitales (azul tripán) reveló que la mayor viabilidad celular correspondió a los pases cinco, seis y siete, aunque principalmente al pase seis. Estos resultados sugieren que estos pases serían los más adecuados para aplicación clínica.
4. La evaluación de la viabilidad de los condrocitos fibrosos del disco articular de la ATM durante los 9 primeros pases celulares mediante la determinación del perfil iónico cuantitativo mediante microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X reveló que la mayor viabilidad celular correspondió al pase seis, lo cual sugiere de nuevo que éste sería el pase más adecuado para utilización terapéutica.
5. La evaluación de la viabilidad de los condrocitos fibrosos del disco articular de la ATM durante los 9 primeros pases celulares mediante el cálculo de la Viabilidad Media reveló que la mayor viabilidad celular correspondió a los pases cinco y seis, los cuales deberían constituir los pases de elección en protocolos de Ingeniería Tisular relacionados con el disco articular de la ATM del adulto humano.
6. La evaluación de la viabilidad de los condrocitos fibrosos del disco articular de la ATM durante los 9 primeros pases celulares mediante la determinación del perfil de expresión génica global utilizando *microarray* de ARN reveló la existencia de un gran número de genes con correlación positiva o negativa con la viabilidad celular, incluyendo numerosos genes

cuyo papel fundamental era el control de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular programada. El equilibrio de genes proapoptóticos y antiapoptóticos podría ser el responsable de los cambios de viabilidad celular encontrados en los 9 pases celulares analizados en esta Tesis Doctoral.

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham EH, Breslow JL, Epstein J, Chang-Sing P and Lechene C. Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport. *Am J Physiol.* 1985; 248:154-164.

Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Muñoz-Ávila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarosa scaffold. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47:3311-3317.

Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández-Montoya A, Campos A. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007; 1(5):350-359.

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. *J Cell Physiol.* 2007b; 211(3):692-698.

Alaminos M, González-Andrades M, Muñoz-Ávila JI, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Campos A. Volumetric and ionic regulation during the in vitro development of a corneal endothelial barrier. *Exp Eye Res.* 2008; 86(5):758-69.

Ali, AM, and Sharawy, M. Histochemical and immunohistochemical studies of the effects of experimental anterior disc displacement on sulfated glycosaminoglycans, hyaluronic acid, and link protein of the rabbit craniomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 54:992.

Allen JC. Sodium and potassium content and viability of mouse mammary gland tissue and acini. *J Dairy Sci.* 1988; 71(3):633–642.

Allen KD and Athanasiou KA. Effect of passage and topography on gene expression of temporomandibular joint disc cells. *Tissue Eng.* 2007; 13(1):101-10.

Allen KD and Athanasiou KA. Scaffold and growth factor selection in temporomandibular joint disc engineering. *J Dent Res.* 2008; 87(2):180-5.

Almarza AJ and Athanasiou KA. Design characterization for the tissue engineering of cartilaginous tissues. *Ann Biomed Eng.* 2004; 32(1):2-17.

Almarza AJ and Athanasiou KA. Seedind techniques and scaffolding choice for tissue engineering of the temporomandibular joint disc. *Tissue Eng.* 2004; 10:1787.

Almarza AJ and Athanasiou KA. Effects of initial cell seeding density for the tissue engineering of the temporomandibular joint disc. *Ann Biomed Eng.* 2005; 33:943.

Almarza AJ, Bean AC, Baggett LS and Athanasiou KA. Biochemical content and distribution in the porcine temporomandibular joint disc. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 44:124.

Almarza AJ and Athanasiou KA. Evaluation of three growth factors in combinations of two for TMJ disc tissue engineering. *Arch Oral Biol.* 2006; 51:215.

Almarza AJ and Athanasiou KA. Effect hydrostatic pressure on TMJ disc cells. *Tissue Eng.* 2006; 12(5):1285-1294.

Alomar X, Medrano J, Cabratosa J.A *et al.* Anatomy of the temporomandibular joint. *Semin Ultrasound CT MRI.* 2007; 28:170-183.

Amato PA, Loizzi RF. The identification and localization of actin and actin-like filaments in lactating guinea pig mammary gland alveolar cells. *Cell Motil.* 1981; 1(3):329–347.

Anderson DE and Athanasiou KA. A comparision of primary and passaged chondrocytes for use in engineering the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(2):138-45.

Axelsson S, Holmlund A and Hjerpe A. Glycosaminoglycans in normal and osteoarthrotic human temporomandibular joint disks. *Acta Odontol Scand.* 1992; 50(2):113-119.

Balconi G and Dejana E. Cultivation of endothelial cells: Limitations and perspectives. *Med Biol.* 1986; 64(5):231-245.

Bannasch H., Stem-Straeter J., Beier J.P. Tissue Engineering. *Clin Plast Surg.* 2005; 30:573-79.

Barbiero G, Duranti F, Bonelli G, Amenta JS, Baccino FM. Intracellular ionic variations in the apoptotic death of Lcells by inhibitors of cell cycle progression. *Exp Cell Res.* 1995; 217(2):410-418.

Bean AC, Almarza AJ and Athanasiou KA. Effects of ascorbic acid concentration for the tissue engineering of the temporomandibular joint disc. *J Eng Med.* 2006; 220(3):439-447.

Beattie GM, Butler C, Hayek A. Morphology and function of cultured human fetal pancreatic cells transplanted into athymic mice: a longitudinal study. *Cell Transplant.* 1994; 3(5):421–425.

Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, Coubes P, Echenne B, Ibrahim R, Irthum B, Jacquet G, Lonjon M, Moreau JJ, Neau JP, Parker F, Tremoulet M, Tournier-Lasserre E. Societe Francaise de Neurochirurgie. Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet.* 2005; 76:42-51.

Berger ML, Reynolds RC, Hagler HK, Bellotto D, Parsons D, Mulligan KJ, Buja LM. Anoxic hepatocyte injury: role of reversible changes in elemental content and distribution. *Hepatology.* 1989; 9(2):219-228.

Berkovitz BK and Pacy J. Age changes in the cells of the intra-articular disc of the temporomandibular joints of rats and marmosets. *Arch Oral Biol.* 2000; 45:987.

Bhuyan BK, Loughman BE, Fraser TJ, Day KJ. Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Exp Cell Res.* 1976; 97(2):275–280.

Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M, Ehrentreich-Förster E, Reiss E, Henkel J, Strehlow R, Andresen D. DNA *microarray*. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2008; 109:433-453.

Black J. Systemic effects of biomaterials. *Biomaterials.* 1984; 5:11-8.

Borja A. Utilización de Mitek® mini anchors en cirugía de la articulación temporomandibular. Presentación de la técnica quirúrgica. *Rev Esp Cirg Oral y Maxilofac.* 1996; 18:228.

Bowtell DD. Options available-from start to finish-for obtaining expression data by microarray. *Nat Genet.* 1999; 21(1 Suppl):25-32.

Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine

embryonic stem cells. *Nature*. 2006; 441(7091):349-353.

Brink CB, Pretorius A, van Niekerk BP, Oliver DW, Venter DP. Studies on cellular resilience and adaptation following acute and repetitive exposure to ozone in cultured human epithelial (HeLa) cells. *Redox Rep*. 2008; 13(2):87-100.

Buja LM, Hagler HK, Parsons D, Chien K, Reynolds RC, Willerson JT. Alterations of ultrastructure and elemental composition in cultured neonatal rat cardiac myocytes after metabolic inhibition with iodoacetic acid. *Lab Invest*. 1985; 53(4):397-411.

Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, García-Quintanilla A, Cano J, Brundin P, Englund E, Venero JL, Joseph B. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature*. 2011; 472: 319-324.

Campos A, López-Escámez J.A, Cañizarez FJ, Crespo PV. Electrón probe X-ray microanálisis of Ca and K distributions in the otolithinc membrana, *Micro and Microscopica Acta*. 1992; 23:349-350.

Campos A, López-Escámez J.A, Crespo PV, Cañizarez FJ, Baeyens J.M. Gentamicin ototoxicity in otoconia: quantitative electrón probe x-ray microanalysis, *Acta Otolaryngol*. 1994; 114:18-23.

Campos, A. *Cuerpo, histología y medicina. De la descripción microscópica a la Ingeniería Tisular. Discurso de ingreso. Real Academia Nacional de Medicina. Madrid. 2004.*

Carini, R. Autelli, G. Bellomo, M.U. Dianzani, and E. Albano. Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxin. *Biochim Biophys Res commun*. 1995; 206:180-185.

Carini, G. Bellomo, M.G. de Cesaris, and E. Albano. Glycine protect against hepatocyte killing by kcn or hypoxia by preventing intracellular na- overload in the rat. *Hepatology*. 1997; 26:107-112.

Carini R, M.G. de Cesaris, R.Splendore, M. Bagnati, G. Bellomo, and E. Alabano. Alterations of na-homeostasis in hepatocyte reoxygenation injury. *Biochim biophys acta*. 2000; 1500:297-305.

Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, McManus BM. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33(9):1673-90.

Christensen LV, Rassouli NM. Experimental occlusal interferences IV. Mandibular rotations induced by a pliable interference. *J Oral Rehabil.* 1995; 22 (11):835-44.

Chouraki M. *Conférences sur l'articulation temporomandibulaire*, tomo 1. Deverlaque 1986.

Coco-Martin JM, Oberink JW, van der Velden-de Groot TA, Beuvery EC. Viability measurements of hybridoma cells in suspension cultures. *Cytotechnology.* 1992; 8(1): 57-64.

Crespo PV, López-Escámez JA, Cañizares FJ, Campos A. X-ray microanalytical determination of P, S, and K concentrations in the gelatinous membrane of utricle. *Acta Otolaryngol Stockh.* 1993; 113:176-180.

Da Costa AO, de Assis MC, Marques Ede A, Plotkowski MC. Comparative analysis of three methods to assess viability of mammalian cells in culture. *Biocell.* 1999; 23(1): 65-72.

De Diego E, Villanueva A, Roca A, Martín B, Meana A, Gómez S y Gomez J. Estudio experimental sobre la viabilidad del injerto libre de epitelio urinario autólogo cultivado *in vitro*. *Actas Urol Esp.* 2004; 28:714-731.

De Oca Luna RM, Tabor AD, Eberspaecher H, Hulboy DL, Worth LL, Colman MS, Finlay CA, Lozano G. The organization and expression of the mdm2 gene. *Genomics.* 1996; 33:352-357.

Debbage P. Distinctive structural and cytoskeletal properties of the long-surviving neurons in cell cultures of embryonic spinal cord. *Neuroscience.* 1985; 14(1):207-224.

Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappa-B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* 1997; 7:813-820.

Detamore MS and Athanasiou KA. Motivation, characterization, and strategy for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Tissue Eng.* 2003; 9:1065.

Detamore MS and Athanasiou KA. Structure and function of the temporomandibular joint disc: implications for tissue engineering. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61:494.

Detamore MS and Athanasiou KA. Effects of growth factors on temporomandibular joint disc cells. *Arch Oral Biol.* 2004; 49:577.

Detamore MS and Athanasiou KA. Evaluation of three growth factors for TMJ disc tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 2005; 33:383.

Detamore MS and Athanasiou KA. Use of a rotating bioreactor toward tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Tissue Eng.* 2005; 11:1188.

Detamore MS, Orfanos JG, Almarza AJ, French MM, Wong ME y Athanasiou KA. Quantitative analysis and comparative regional investigation of the extracellular matrix of the porcine temporomandibular joint disc. *Matrix Biology.* 2005; 24(1):45-57.

Detamore MS, Hegde JN, Wagle RR, Almarza AJ, Montufar-Solis D, Duke PJ and Athanasiou KA. Cell type and distribution in the porcine temporomandibular joint disc. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 64(2):243-248.

Devocht J. Development of a finite element model to stimulate and study the biomechanics of the temporomandibular joint. Department of biomedical engineering. University of Iowa. 1993.

Di Francesco A, Desnoyer RW, Covacci V, Wolf FI, Romani A, Cittadini A, Bond M. Changes in magnesium content and subcellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 360(2):149-157.

Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS. Structure of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 54:332-338.

Dolwick MF. The temporomandibular joint: Normal and abnormal anatomy. In: Helms, C.A., Katzberg, R.W., and Dolwick, M.F., eds. *Internal Derangements of the Temporomandibular Joint.* San Francisco, CA: Radiology Research and Education Foundation. 1983; pp. 1–14.

Dolwick MF. Surgical management. In: Helms, C.A., Katzberg, R.W., and Dolwick, M.F., eds. *Internal Derangements of the Temporomandibular Joint.* San Francisco, CA: Radiology Research and Education Foundation. 1983; pp. 167–192.

Dolwick MF. Disc preservation surgery for the treatment of internal derangements of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 59:1047.

Emilson LB, Dougherty KA, Cockett AT, Urry RL. Simultaneous determination of human sperm morphology and viability: simple office technique. *Urology.* 1978; 11(5): 488–491.

Farrar WB and McCarty WL Jr. The TMJ dilemma. *J Ala Dent Assoc.* 1979; 63:19.

Feinberg SE, Larsen PE. Reconstruction of the temporomandibular joint with pedicled temporalis muscle flaps. In Bell WH (ed): *Modern practice in Orthognatic and Reconstructive Surgery.* Philadelphia, WB Saunders. 1992; 733.

Fernández Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A. Electron probe X-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int.* 1997a; 21:665-669.

Fernández Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A. Backscattered electron imaging of cultured cells: application to electron probe X-ray microanalysis using a scanning electron microscope. *J Microsc.* 1997b; 188:72-8.

Fernández Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp Cell Res.* 1999; 253:454-462.

Fernández-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Campos A, Warley A. A procedure to prepare cultured cells in suspension for electrón probe X-ray microanalysis: application to scanning and transmission electron microscopy, *Journal of Microscopy.* 1999; 196:19-25.

Finn G. *Histología.* Editorial Médica Panamericana, Tercera Edición, Madrid. 2002; 263-267.

Friemert C, Erfle V, Strauss G. Preparation of radiolabeled cDNA probes with high specific activity for rapid screening of gene expression. *Methods Mol Cell Biol.* 1989; 1:143-153.

Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP. Tissue Engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg.* 2001; 72:577-591.

Fukuta K, Jackson IT, Topf JS. Facial lawn mower injury treated by a vascularized costochondral graft. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992; 50:194-8.

Garzón I, Pérez-Köhler B, Garrido-Gómez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martín-Piedra MA, García-Honduvilla N, Buján J, Campos A, Alaminos M. Evaluation of the Cell Viability of Human Wharton's Jelly Stem Cells for Use in Cell Therapy. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012 Jan 26.

Geschickter CF. The Application of Dyes in the Cancer Problem. *Biotech Histochem.* 1930; 5(2):49-64.

Gill RT. Enabling inverse metabolic engineering through genomics. *Curr Opin Biotechnol.* 2003; 14(5):484-490.

Girdler NM. *In vitro* synthesis and characterization of a cartilaginous meniscus grown from isolated temporomandibular chondroprogenitor cells. *Scand J Rheumatol.* 1998; 27:446.

Girdler NM. Bioengineering of cartilage in organ culture. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1995; 24:318.

Glowaki J, Yates KE, McLean R, Mizuno S. *In vitro* engineering of cartilage: effects of serum substitutes, TGF-B, and IL-1 alfa. *Orthod Craniofacial Res.* 2005; 8:200-208.

Goldstein AD, Roming DE, Newbury CE, Lyman P, Echlin PC, Fioror DC, Joy and E. Lifshin. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis.* Plenum Press, New York. 1992.

Gómez de Ferraris ME y Campos Muñoz A. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental.* 2009.

Gorti GK, Lo J, Falsafi S, Kosek J, Quan SY, Khuu DT, Koch RJ. Cartilage tissue engineering using cryogenic chondrocytes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 129(8):889-93.

Green WT. Basic science and pathology. *J Orthop Res.* 1977; 124:237-250.

Gress TM, Hoheisel JD, Lennon GG, Zehetner G, Lehrach H. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome.* 1992; 3(11):609-619.

Gross A, Bumann A and Hoffmeister B. Elastic fibers in the human temporomandibular joint disc. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1999; 28:464.

Guerne PA, Sublet A, and Lotz M. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: Distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1994; 158:476.

Hall TA. Capabilities and limitations of probe methods for the microanalysis of chemical elements in biology: a brief introduction. *Ultramicroscopy.* 1988; 24:181-184.

Henry CH, Wolford LM. Treatment outcomes for temporomandibular joint reconstruction after Proplast-Teflon implant failure. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993; 51:352-5.

Hicks DL, Sage AB, Schumacher BL, Jadin KD, Agustin RM, Sah RL, Watson D. Stored human septal chondrocyte viability analyzed by confocal microscopy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 132(10):1137-42.

Holmlund A, Hellsing G. Arthroscopy of the temporomandibular joint: occurrence and location of osteoarthrosis and synovitis in a patient material. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1988; 17(1):36-40.

Hongpaisan J and Roomans GM. Retaining ionic concentrations during *in vitro* storage of tissue for microanalytical studies. *J Microsc.* 1999; 193(Pt 3):257-67.

Hoskins JM, Meynell GG, Sanders FK. A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumour cells. *Exp Cell Res.* 1956; 11(2):297-305.

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa-B activation. *Cell.* 1995; 81:495-504.

Hu J, Xu YJ, Zhang ZX, Tian F. Effect of cigarette smoke extract on proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells and the relevant roles of protein kinase C. *Chin Med J (Engl).* 2007; Sep 5; 120(17):1523-8.

Hughes FM Jr, Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA. Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem.* 1997; 272(48):30567-30576.

Ikegami E, Fukazagua F, Kambe M, Watanabe M, Kamisago M, Hajikano M, Katsube Y, Owaba S. 2007; 71:(11):1815:1820.

Ioannides C, Maltha JC. Replacement of the intraarticular disc of the craniomandibular joint with fresh autogenous sterna or auricular cartilage. *J Craniomaxillofac Surg* 1988; 16:343-9.

Jagger R.G, Bates J.F and Kopp, S. *Temporomandibular Joint Dysfunction: Essentials*. Oxford: Butterworth-Heinemann. 1994.

Jaluria P, Chu C, Betenbaugh M, Shiloach J. Cells by design: a mini-review of targeting cell engineering using DNA *microarray*. *Mol Biotechnol*. 2008; 39(2):105-111.

Jaluria P, Konstantopoulos K, Betenbaugh M, Shiloach J. A perspective on *microarray*: current applications, pitfalls, and potential uses. *Microb Cell Fact*. 2007; 6:4.

Johns DE and Athanasiou KA. Design characteristics for temporomandibular joint disc tissue engineering: learning from tendon and articular cartilage. *Proc Inst Mech Eng H*. 2007; 221(5):509-26. Review.

Johns DE and Athanasiou KA. Improving culture conditions for temporomandibular joint disc tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2007; 185(4):246-57.

Johns DE, Wong ME and Athanasiou KA. Clinically relevant cell sources for TMJ disc engineering. *J Dent Res*. 2008; 87(6):548-52.

Johnson EM Jr, Deckwerth TL. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci*. 1993; 16:31-46.

Kalpakci KN, Kim EJ, Athanasiou KA. Assessment of growth factor treatment on fibrochondrocyte and chondrocyte co-culture for TMJ fibrocartilage engineering. *Acta Biomater*. 2011; 7(4):1710-8.

Kang H, Bi YD, Li ZQ, Qi MY, Peng EM. Effect of transforming growth factor β (1) and insulin-like growth factor-I on extracellular matrix synthesis of self-assembled constructs of goat temporomandibular joint disc. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2011; 46(9):541-6.

Kopp S. Degenerative and inflammatory joint disorders; clinical perspectives. In: Sessle B, editor. *Temporomandibular disorders and related pain conditions: progress in pain research and management*, Vol 4. Seattle (WA): IASP Press: 1995.

Kummoona R. Chondro-osseus iliac crest graft for one stage reconstruction of the ankylosis TMJ in children. *J Maxillofac Surg.* 1986; 14:215-20.

Landesberg R, Takeuchi E, and Puzas JE. Cellular, biochemical and molecular characterization of the bovine temporomandibular joint disc. *Arch Oral Biol.* 1996; 44:761.

Landesberg R, Takeuchi E, and Puzas JE. Differential activation by cytokines of mitogen-activated protein kinases in bovine temporomandibular-joint disc cells. *Arch. Oral Biol.* 1999; 44:41.

Langer R, Vacanti JP. *Tissue Engineering. Science.* 1993; 260(5110):920-6.

Lee TC, Li L, Philipson L, Ziff EB. Myc represses transcription of the growth arrest gene gas1. *Proc Nat Acad Sci.* 1997; 94: 12886-12891.

Lienau J, Schell H, Duda G. Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthopae Res.* 2005; 23:639-45.

Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature.* 1996; 379: 349-353.

Llames SG, Del Rio M, Larcher F, García E, García M, Escamez MJ, Jorcano JL, Holguín P, Meana A. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation.* 2004; 15; 77(3):350-5.

LoPachin RM, Castiglia CM, Lehning E, Saubermann AJ. Effects of acrylamide on subcellular distribution of elements in rat sciatic nerve myelinated axons and Schwann cells. *Brain Res.* 1993; 16; 608(2):238-46.

López-Escámez JA, Cañizares FJ, Crespo PV, Campos A. Electrón probe microanálisis of otholitic membrana. A methodological and quantitative study. *Scanning microscopy.* 1992a; 6:765-772.

López-Escámez JA, Crespo PV, Cañizares FJ, Campos A. Dependence between saccule and utricle in Ca and K concentrations determined by electrón probe X-ray microanalysis. *Micron and microscopica Acta.* 1992b; 23:367-368.

López-Escámez JA, Crespo PV, Cañizares FJ, Campos A. Standards for quantification of element in the otholithic membrana by electrón probe x-ray microanalysis: calibration curves and electron beam sensivity. *Journal of Microscopy*. 1993; 171:215-222.

López-Escámez JA, Campos A. Standards for X-ray microanalysis of calcified structures. *Scanning Microscopy*. 1994; 8:171-185.

Lysaght MJ, Reyes J. The growth of tissue engineering. *Tissue Eng*. 2001; 7:485-524.

Mäenpää K, Ellä V, Mauno J, Kellomäki M, Suuronen R, Ylikomi T, Miettinen S. Use of adipose stem cells and polylactide discs for tissue engineering of the temporomandibular joint disc. *J R Soc Interface*. 2010 6; 7(42):177-88.

Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, *et al*. Fas induced caspasa denitrosylation. *Science*. 1999; 284: 651-654.

Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol*. 1997; 7:1003-1006.

Matukas VJ, Lachner J. The use of autogenous auricular cartilage for temporomandibular joint disk replacement: A preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg*. 1990; 48:348.

Mercuri LG. Alloplastic temporomandibular joint reconstruction. *Oral Surg*. 1998; 85:631-7.

Mercuri LG. Considering total alloplastic temporomandibular joint replacement. *Cranio*. 1999; 17:44-8

Milam SB, Klebe RJ, Triplett RG and Herbert D. Characterization of the extracellular matrix of the primate temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg*. 1991; 49:381.

Mills DK, Daniel JC and Scapino R. Histological features and in-vitro proteoglycan synthesis in the rabbit craniomandibular joint disc. *Arch Oral Biol*. 1988; 33:195.

Mills DK, Fiandaca DJ and Scapino RP. Morphologic, microscopic, and immunohistochemical investigations into the function of the primate TMJ disc. *J Orofac Pain*. 1994; 8(2):136-154.

Minarelli AM y Liberti EA. A microscopic survey of the human temporomandibular joint disc. *J Oral Rehabil.* 1997; 24(11):835-840.

Mizoguchi I, Scott PG, Dodd CM, Rahemtulla F, Sasano Y, Kuwabara M, Satoh S, Saitoh S, Hatakeyama Y, Kagayama M and Mitani H. An immunohistochemical study of the localization of biglycan, decorin and large chondroitin-sulphate proteoglycan in adult rat temporomandibular joint disc. *Arch Oral Biology.* 1998; 43(11):889-898.

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George DL, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 1992; 26; 69(7):1237-1245.

Murray GM, Bhutada M, Peck CC, Phanachet I, Sae-Lee D, Whittle T. *Arch Oral Biol.* 2007; 52:377-380.

Nakano T and Scott PG. A quantitative chemical study of glycosaminoglycans in the articular disc of the bovine Temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 1989; 34(9):749-757.

Nakano T and Scott PG. Changes in the chemical composition of the bovine temporomandibular joint disc with age. *Arch Oral Biol.* 1996; 41:845.

Nerem R.M. and Sambanis a. Tissue engineering: From biology to biological substitutes. *Tissue Eng.* 1995; 1:3-13.

Nitzan DW. The process of lubrication impairment and its involvement in temporomandibular joint disc displacement: a theoretical concept. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 59(1):36-45.

Nyberg J, Adell R, Svensson B. Temporomandibular joint discectomy for treatment of unilateral internal derangements-a 5 year follow-up evaluation. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(1):8-12.

Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell.* 2000; 102:849-862.

O'Dell NL, Starcher BC, Wilson JT, Pennington CB and Jones GA. Morphological and biochemical evidence for elastic fibres in the Syrian hamster temporomandibular joint disc. *Arch Oral Biology.* 1990; 35(10):807-811.

Ogus H.D and Toller P.A. Common Disorders of the Temporomandibular Joint, 2nd ed. Bristol, UK: John Wright & Sons, 1986.

Onishi M. Arthroscopy of the temporomandibular joint. *Kokubyo Gakkai Zasshi*. 1975; 42:207-13.

Pan G, Ni J, Yu G, Wei YF, Dixit, VM. TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett*. 1998; 424:41-45.

Park C, Moon DO, Ryu CH, Choi BT, Lee WH, Kim GY, Choi YH. Beta-sitosterol sensitizes MDA-MB-231 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Acta Pharmacol Sin*. 2008; 29(3):341-8.

Patterson MK Jr. In measurement of growth and viability of cells in culture. 1^a ed. New York: IH Pastarf, Academic Press. 1979; 150–155.

Phillips HJ, Terryberry JE. Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp CellRes*. 1957; 13(2):341–347.

Phillips HJ. In dye exclusion tests for cell viability. 2^a ed. New York: Academic Press. 1973; 406–411.

Posadas I, Vellecco V, Santos P, Prieto-Lloret J, Ceña V. Acetaminophen potentiates staurosporine-induced death in a human neuroblastoma cell line. *Br J Pharmacol*. 2007; 150(5):577-85.

Poshusta AK and Anseth KS. Photopolymerized biomaterials for application in the temporomandibular joint. *Cells Tissues Organs*. 2001; 169:272.

Puelacher WC, Wisser J, Vacanti CA, Ferraro NF, Jaramillo D and Vacanti JP. Temporomandibular joint disc replacement made by tissue-engineered growth of cartilage. *J Oral Maxillofac Surg*. 1994; 52:1172.

Rees LA. The structure and function of the mandibular joint. *Br Dent J*. 1954; 96:125.

Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater*. 2005; 14(9):23-32.

Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975a; 6(3):331-36.

Rheinwald JG, Green H (1). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975b; 6(3): 331-43.

Rheinwald JG, Green H (2). Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell*. 1975c; 6(3):317-30.

Rinaldi M, Tricarico M, Bonmassar E, Parrella P, Barrera G, Fazio VM. Effect of 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation on NK susceptibility of human K562 target cells. *Anticancer Res*. 1998; 18(5A):3591-5.

Rodríguez IA, López-González G, Rodríguez MA, Campos-Sánchez F, Alaminos M. Biological evaluation of 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) toxicity in human gingival fibroblasts with histochemical X-ray microanalysis. *J Adhes Dent*. 2011; 13(4):375-81.

Rodríguez-Morata A, Garzón I, Alaminos M, Garcia-Honduvilla N, Sanchez-Quevedo MC, Bujan J, Campos A. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg*. 2008; 22(3):440–448.

Rojas-Sánchez F, Alaminos M, Campos A, Rivera H, Sánchez-Quevedo MC. Dentin in severe fluorosis: a quantitative histochemical study. *J Dent Res*. 2007; 86(9):857-61.

Roomans GM, Von Euler A. X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology. *Cell Biol Int*. 1996; 20(2):103-109.

Roomans GM. X-ray microanalysis of cultured cells in the scanning electron microscope and in the scanning transmission electron microscope: A comparison. *Scanning Microsc*. 1999; 13(1):159-165.

Roomans GM. Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur Cell Mater*. 2002; 3:1-8.

Roomans GM. X-ray microanalysis of epithelial cell monoculture. *Methods Mol Biol*. 2002b; 188:273-289.

Rosales R. Aislamiento y control de calidad microanalítico para ingeniería tisular de los condrocitos del tejido cartilaginoso hialino y fibroso (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, 2008.

Sánchez-Quevedo MC, Crespo PV, García JM, Campos A. X-ray microanalytical histochemistry of human circumpulpar and mantle dentine. *Bone Miner.* 1989; 6(3): 323-329.

Sánchez-Quevedo C, Ceballos G, Rodríguez IA, García JM, Alaminos M. Acid-etching effects in hypomineralized amelogenesis imperfecta. A microscopic and microanalytical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006; 11(1):E40-3.

Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitán LM, Moreu G, Garzón I, Crespo PV, Campos A. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol.* 2007; 22(6):631-640.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995; 270(5235):467-470.

Sher S, Hull B, Rosen S, Church D, Friedman L and Bell E. Acceptance of allogenic fibroblast in skin equivalent transplants. *Transplantation.* 1983; 36:552-557. 1983.

Shinishi A, Yoshihito O, Yoshinobu I. Perspectives on the role of lateral pterigoide muscle and the sphenomandibular ligament in temporomandibular joint function. *Journal of Craniomandibular Practice.* 1997.

Sidebottom AJ. Current thinking in temporomandibular joint management. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 47(2):91-4.

Skalak R, Fox F. *Tissue Engineering.* New York: Liss, 1988.

Snyder CC, Benson AK, Slater PV. Construction of the temporomandibular joint by transplanting autogenous sternoclavicular joint. *South Med J.* 1971; 64:807-14.

Springer IN, Fleiner B, Jepsen S and Acil Y. Culture of cells gained from temporomandibular joint cartilage on non-absorbable scaffolds. *Biomaterials.* 2001; 22:2569.

Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Nöth U. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9(3):213.

Su X, Kang H. Cell sources for engineered temporomandibular joint disc tissue: present and future. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2010; 27(2):463-6.

Takatsuka S, Narinobou M, Nakagawa K. Histologic evaluation of articular cartilage grafts after discectomy in the rabbit craniomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54:1216-25.

Tao SC, Chen CS, Zhu H. Applications of protein microarray technology. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2007; 10(8):706-718.

Taylor GI. Reconstruction of the mandible with free composite iliac crest bone graft. *Ann Plast Surg*. 1982; 9:361-76.

Thomas M, Grande D and Haug RH. Development of an *in vitro* temporomandibular joint cartilage analog. *J Oral Maxillofac Surg*. 1991; 49:854.

Tucker MR, Jacoway JR, White RP. Autogenous dermal grafts for repair of temporomandibular joint disc perforations. *J Oral Maxillofac Surg*. 1986; 44:781.

Tucker MR, Kennady MC, Jacoway JR. Autogenous auricular cartilage implantation following discectomy in the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg*. 1990; 48:38.

Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003; 5(5):235-8.

Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Nat Acad Sci*. 1996; 93: 4974-4978.

Vanthanouvong V, Hogman M, Roomans GM. *In vitro* and *in situ* experimental model for X-ray microanalysis of intestinal epithelium. *Microscopy Res Tech*. 2003; 62:211-217.

Von Euler A, Palsgard E, von Steyern CV, Roomans GM. X-ray microanalysis of epithelial and secretory cells in culture. *Scanning Microsc*. 1993; 7(1):191-201.

Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J*. 1997; 16: 5386-5397.

Warley A, Fernández-Segura E, López-Escámez JA, Campos A. Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis. *Cell Biology International*. 1994; 18:915-916.

Warley A. X-ray microanalysis for biologists. Practical methods in electron microscopy. Glauert AM. (ed) Portland Press, London. 1997.

Warley A. The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc*. 1994a; 8:129-37.

Warley A, Cracknell KPB, Cammish HB, Twort CHC, Ward JPT, Hisrt SJ. Preparation of cultured airway smooth muscle for study of intracellular element concentration by X-ray microanalysis: comparison of whole cells with cryosections. *J Microsc*. 1994b; 175:143-53.

Warley A, Skepper JN. Long freeze-drying times are not necessary during the preparation of thin sections for X-ray microanalysis. *J Microsc*. 2000; 198:116-23.

Wax MK, Winslow CP *et al*. A retrospective analysis of temporomandibular joint reconstruction with free fibula microvascular flap. *Laryngoscope*. 2000; 110:977-81.

Wiesel JM, Gamiel H, Vlodaysky I, Gay I, Ben-Bassat H. Cell attachment, growth characteristics and surface morphology of human upper-respiratory tract epithelium cultured on extracellular matrix. *Eur J Clin Invest*. 1983; 13(1):57–63.

Wildmalm SE, Westesson PL, Brooks SL *et al*. Temporomandibular joint sounds: correlation to joint structure in fresh autopsy specimens. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1992; 101(1):60-9.

Wilkes CH. Internal derangements of the temporomandibular joint: Pathological variations. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg*. 1989; 115:469.

Wiltgen M, Tilz GP. DNA microarray analysis: principles and clinical impact. *Hematology*. 2007; 12(4):271-287.

Wolford LM, Cottrel DA, Henry C. Sternoclavicular grafts for temporomandibular joint reconstruction. *J Oral Maxillofac Surg*. 1994; 52:119-28.

Wong DC, Wong KT, Lee YY, Morin PN, Heng CK, Yap MG. Transcriptional profiling of apoptotic pathways in batch and fed-batch CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng*. 2006; 94(2):373-382.

Wroblewski J, Muller RM, Wroblewski R, Roomans GM. Quantitative X-ray microanalysis of semi-thick cryosections. *Histochemistry*. 1983; 77(4):447-63.

Wroblewski J, Roomans GM. X-ray microanalysis of single and cultured cells. *Sacn Electron Microsc.* 1984; 4:1875-82.

Zhu C and Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45(6):1743-1751.

Zierold K, Schäfer D. Preparation of cultured and isolated cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* 1988; 2:1775-90.

Zierold K. Effects of cadmium on electrolyte ions in cultured rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis of cryosections. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997; 144:70–76.

Zilberman D, Henikoff S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development*. 2007, 134(22):3959-3965.