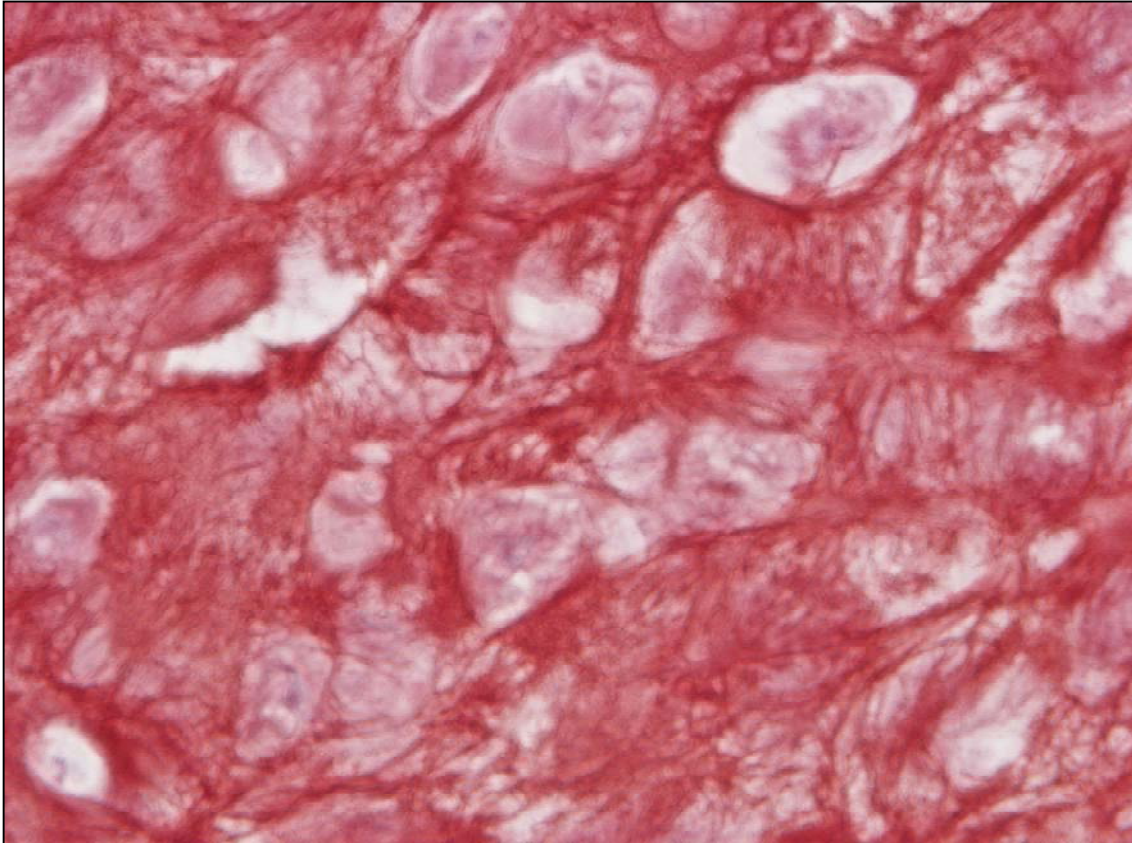




UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA



**GENERACIÓN DE SUSTITUTO BIOMIMÉTICO DE CARTÍLAGO
ARTIFICIAL CON MATRIZ EXTRACELULAR DE FIBRINA-
AGAROSA Y CONDROCITOS HUMANOS PARA SU
UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR MAXILOFACIAL.**

TESIS DOCTORAL

Laura Adriana García Martínez
Programa de Doctorado en Biomedicina
Granada, España 2017



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA

**GENERACIÓN DE SUSTITUTO BIOMIMÉTICO DE CARTÍLAGO
ARTIFICIAL CON MATRIZ EXTRACELULAR DE FIBRINA
AGAROSA Y CONDROCITOS HUMANOS PARA SU
UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR MAXILOFACIAL.**

Memoria que presenta la Licenciada en Odontología y Máster en Investigación
Odontológica Laura Adriana García Martínez
Para optar al título de Doctor

Fdo.: Laura Adriana García Martínez

Director de Tesis
Prof. Dr. Víctor Sebastián Carriel Araya.
Doctor en Biomedicina
Universidad de Granada, España

Directora de Tesis
Profa. Dra. Ingrid Johanna Garzón Bello.
Doctora en Biomedicina
Universidad de Granada, España

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Laura Adriana García Martínez
ISBN: 978-84-9163-632-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48618>

El doctorando / The *doctoral candidate* [**LAURA ADRIANA GARCÍA MARTÍNEZ**] y los directores de la tesis / and the thesis supervisor/s: [**Dr. VICTOR S. CARRIEL ARAYA,**

Dra. INGRID J. GARZÓN BELLO.]

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Lugar y fecha / Place and date:

Granada 02 de Mayo del 2017

Director/es de la Tesis / *Thesis supervisor/s*;

Doctorando / *Doctoral candidate*:

Firma / Signed

Firma / Signed



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 PI-0653-2013 de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, por el proyecto de investigación GREIB PP2012-P109 (Proyectos de investigación precompetitivos del plan propio) de la Universidad de Granada y del Vicerrectorado de Política e Investigación.

A la memoria de mi hermano Julio Alfredo

DEDICATORIA

Esta Tesis va dedicada en primer lugar a Dios, por haberme dado la oportunidad de existir y aprender en este ciclo de vida.

A mi Madre Josefa Milagros Martínez Estévez, te dedico esta Tesis como agradecimiento a todo el apoyo que me has brindado siempre. Has estado allí cada momento que caía para levantarme, me has apoyado en todos y cada uno de mis sueños, alentándome a seguirlos y empujándome a que luche por lo que quiero, aunque eso significara un gran dolor para ti, como lo fue el haberme ido del país y de tu lado. Siempre te has sacrificado para que yo persiga libremente mis sueños. Gracias por la vida y por tu eterno apoyo, y sobre todo, en estos años que he pasado fuera de casa, y que sin tus palabras diarias de aliento y ánimo no hubiera podido continuar. Gracias por levantarme cada vez que caigo, por estar allí, por consolarme y secar mis lágrimas, y también por las risas y buenos ratos. Gracias Ma. El Título que obtendré al presentar esta Tesis, te lo mereces tú más que yo.

En especial dedico mi Tesis a mi hermano Julio Alfredo. En tu honor va este y todos mis éxitos. Fuiste, eres y serás la persona más especial e inteligente que he conocido en mi vida. Tu sabiduría fue incomparable, no te hacía falta estudiar nada, porque ya todo lo sabías, fuiste mi maestro en tantas cosas y lo seguirás siendo, hasta que nos volvamos a encontrar. Quiero dejar plasmados dos momentos muy especiales que viví contigo y la histología, que aún están tan frescos en mi memoria, como si acabaran de suceder. El primero, cuando yo cursaba primero de carrera, eran aproximadamente las 3 de la madrugada, te despertaste y me viste estudiando el Geneser (mi libro favorito), me preguntaste: ¿Niña que haces despierta a esta hora? Respondí: Tengo parcial de Histología. Me pediste una hoja de papel y comenzaste a recortarla. Transcurridos los minutos me dijiste “Toma son unos muñequitos, los amiguitos, así no estudiarás sola”. Luego me hiciste unos más chiquitos para que me acompañaran en mis exámenes. Al día de hoy, los amiguitos siguen conmigo, acompañándome en cada momento importante de mi vida. La segunda, ya terminando primero de carrera, mientras estudiaba histología y embriología, me preguntaste: ¿Qué haces? Respondí: “Estudio embriología, pero es complicada”. Solo me pediste el tema que estaba estudiando. Recuerdo que te llevaste el capítulo de desarrollo embriológico, y regresaste a la media

hora aproximadamente, a explicarme el tema, mejor que ninguno de mis profesores, sin tu haber estudiado nunca antes nada relacionado, y no solo eso, sino que te inventaste una canción, solo para que yo pudiera aprender ese tema tan confuso para mí, y así fue, lo aprendí tan fácilmente como un juego de niños, gracias a ti. Así fuiste tu hermano, un ser excepcional desde todo punto de vista, un alma noble y una mente privilegiada como pocas. Ha sido un honor para mí ser tu hermana en esta vida y quiero que siempre estés orgulloso de tu hermanita.

Dedico mi Tesis a mi padre Julio García Benito, cuya bondad, nobleza y gran inteligencia se plasmaba en cada uno de sus actos. Gracias por existir, aunque no pudiste acompañarme en esta etapa de mi vida, ya que estas junto a mi hermano, sé, que donde quiera que te encuentres debes estar orgulloso de mí. Nos veremos cuando Dios nos vuelva a reencontrar. Mi agradecimiento eterno por tus enseñanzas, por darme la vida y acompañarme en ella.

A mi tía Elvira García Benito, por brindarme su apoyo estos años, por su confianza, sus enseñanzas y porque la vida a veces nos da sorpresas maravillosas.

Quiero dedicar esta Tesis a mis bisabuelos y abuelos maternos Manuel Martínez Cabaleiro, Josefa Barros González, Isidoro Estévez Martínez, Preciosa Martínez Barros, José Martínez Barros y Josefa Estévez Martínez, mis bisabuelos y abuelos paternos José Benito Galván, María Santacruz de Castro, Alfredo Garcimonteavaro Martínez, Elvira Nieto, Julio García Nieto y María Benito Santacruz. Aunque nunca los llegué a conocer, este es mi homenaje para ellos, ya que si sus vidas no se hubieran cruzado, mis padres no hubieran nacido y yo hoy no estaría aquí.

A la vida, a mi Alma máter y a mi Patria.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a la realización de esta Tesis. En primer lugar, al Profesor Antonio Campos y al Profesor Miguel Alaminos, dignos ejemplos de dedicación y trabajo incansable y sobretodo de humildad. Gracias por su confianza y por haberme abierto las puertas del Departamento de Histología y del Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular, para poder llevar a cabo mi Tesis Doctoral.

Quiero agradecer a mis Directores: Al Profesor Víctor Carriel, por transmitirme sus conocimientos, por su confianza, gran paciencia y disposición para orientarme en todo momento que lo necesité, y por aguantarme cada vez que me ponía pesada. La Profesora Ingrid Garzón, por sus enseñanzas, demostrando que las cosas se pueden hacer siempre mejor y cuidando al máximo cada detalle.

Al Departamento de Histología, a todos sus profesores y personal, en especial al Profesor José Manuel García por toda la ayuda que me prestó en temas informáticos.

A mis compañeros de laboratorio: Boris, Miguel Ángel, Fernando, Daniel, quienes me han apoyado este tiempo y con quienes compartí muchas horas de trabajo, y por supuesto de risas, cada uno con su particular forma de ser y sentido del humor.

A la ciudad de Granada, por acogerme como una hija más, a mis amigas Granadinas, Tere, Yudi, Bea, Inma, Elena quienes de alguna manera me han apoyado durante este tiempo.

A mis amigos de Venezuela, Milagros, Carlos, Alfredo, Karen, Martha, Mariana, Rosa por su apoyo.

A mi Madre y a mi Tía, por su apoyo y confianza en mí.

A todos, mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. GENERALIDADES DEL TEJIDO CARTILAGINOSO.....	6
1.1 Definición y función del tejido cartilaginoso.....	6
1.2 Histogénesis del tejido cartilaginoso.....	8
1.3 Crecimiento y desarrollo del tejido cartilaginoso.....	12
1.3.1 Crecimiento intersticial o interno del cartílago.....	13
1.3.2 Crecimiento aposicional o exógeno.....	14
2. COMPOSICIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO CARTILAGINOSO.....	15
2.1 Células.....	17
2.2 Matriz extracelular.....	19
2.2.1 Componente fibrilar.....	22
2.2.2 Componente no Fibrilar.....	28
3. VARIEDADES DE TEJIDO CARTILAGINOSO.....	33
3.1 Cartílago hialino.....	33
3.2 Cartílago fibroso o fibrocartílago.....	38
3.3 Cartílago elástico.....	40
4. PATOLOGÍAS DEL TEJIDO CARTILAGINOSO Y SUS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS.....	43
5. TEJIDO CARTILAGINOSO Y SU LOCALIZACIÓN EN EL ÁREA MAXILOFACIAL. PATOLOGÍAS Y ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS.....	46
5.1 Patologías que afectan al cartílago maxilofacial y alternativas terapéuticas.....	46
6. BASES DE LA INGENIERÍA TISULAR.....	50
7. INGENIERIA TISULAR DEL TEJIDO CARTILAGINOSO.....	52
7.1 Células.....	52
7.2 Biomateriales.....	53
7.3 Factores de estimulación.....	56
OBJETIVOS.....	58
2.1 Objetivo general.....	59
2.2 Objetivos específicos.....	59

MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
3.1 Aislamiento y cultivo celular de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico.	61
3.2 Determinación de la viabilidad celular de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico.	62
3.3 Preparación de hidrogeles de fibrina-agarosa y encapsulación de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico.....	63
3.4 Nanoestructuración de los constructos de fibrina-agarosa.....	64
3.5 Análisis histológico.....	66
3.5.1 Procesamiento de muestras.....	66
3.5.2 Técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas.	68
3.4 Análisis estadísticos.....	75
RESULTADOS.....	76
4.1 Generación de cultivos de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico. 77	
4.2 Evaluación de la viabilidad celular determinada mediante la técnica <i>Live/Dead</i> ®. 79	
4.3 Resultados histológicos de la interacción célula-biomaterial.	82
4.4 Resultados histoquímicos e inmunohistoquímicos de la interacción célula-biomaterial.	85
DISCUSIÓN.....	104
CONCLUSIONES.....	121
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124

RESUMEN

El cartílago es un tipo de tejido conectivo especializado, que se caracteriza por estar constituido por condrocitos y una matriz extracelular (MEC) altamente especializada, cuya composición rica en fibras colágenas, fibras elásticas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas, le confieren sus propiedades biomecánicas y su elevada hidratación. Histológicamente, existen tres tipos de cartílago en la especie humana, los cuales se diferencian por la composición de la MEC. Estas variedades son, el cartílago hialino, localizado en las articulaciones sinoviales, en el cartílago de crecimiento de los huesos largos, y en la porción conductora de la vía aérea. El cartílago elástico, que constituye el esqueleto de algunas vísceras, el cual es especialmente importante en el pabellón auricular y conducto auditivo externo y el cartílago fibroso que se localiza en los discos intervertebrales, sínfisis púbica y en la articulación temporomandibular. En el área maxilofacial, tema de especial interés en esta Tesis Doctoral, se localizan los tres tipos de tejido cartilaginoso, el cartílago hialino en el septum nasal, el cartílago elástico en el conducto auditivo externo y pabellón auricular y el fibrocartílago en el disco de la articulación temporomandibular.

El tejido cartilaginoso en sus distintas variedades, se ve afectado por múltiples patologías neoplásicas, congénitas, osteodegenerativas, autoinmunes, traumatismos y diversos síndromes. En el caso del cartílago elástico, tipo de cartílago estudiado en la presente Tesis Doctoral, la patología más frecuente que lo afecta es la microtia, una patología congénita que afecta al pabellón auricular.

Actualmente, aunque existen diversas alternativas terapéuticas para el tratamiento de este tipo de lesiones del pabellón auricular, los resultados no son del todo satisfactorios ni duraderos en el tiempo, requiriendo múltiples intervenciones quirúrgicas con su

amplia gama de complicaciones, por lo cual, la generación de un sustituto adecuado de cartílago elástico para uso clínico, continua siendo un desafío.

En este sentido, en la presente Tesis Doctoral se estudió la generación mediante técnicas de Ingeniería Tisular, de un modelo de cartílago elástico artificial humano utilizando condrocitos humanos derivados de cartílago elástico (CHDCE), encapsulados en un biomaterial, un hidrogel compuesto de fibrina-agarosa nanoestructurado.

Para generar este constructo, se utilizaron condrocitos viables del pase 2 provenientes de pequeñas biopsias de cartílago de pabellón auricular, los cuales fueron encapsulados en el hidrogel de fibrina-agarosa. La generación de los hidrogeles de fibrina-agarosa se realizó a partir de la unión de plasma humano, ácido tranexámico, agarosa tipo VII y cloruro cálcico, para posteriormente ser sometidos a un proceso de nanoestructuración mediante compresión plástica. Se definieron dos grupos de estudio, grupo A con 4.5×10^3 CHDCE/mL y grupo B 45×10^3 CHDCE/mL, los cuales se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 5 semanas.

Posteriormente, las muestras se prepararon para estudios histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos. Los estudios histológicos demostraron que los condrocitos fueron capaces de proliferar, formar grupos, y expresar S100 y Vimentina, marcadores de tejido cartilaginoso. Además, los análisis histoquímicos e inmunohistoquímicos, demostraron que los condrocitos sintetizaron componentes fibrilares de la MEC como fibras elásticas, fibras colágenas tipo I y tipo II, además de componentes no fibrilares como proteoglicanos agrecano, biglicano y versicano. Los resultados sugieren que el biomaterial, hidrogel compuesto de fibrina-agarosa puede ser utilizado para la

generación de constructos en ingeniería tisular de cartílago. Cabe destacar, que este biomaterial de fibrina-agarosa aunque ha sido estudiado y utilizado para la generación de diversos tejidos, es primera vez que se utiliza para la generación de un modelo de cartílago elástico. Sin embargo, son necesarios más estudios de diferenciación celular con medios específicos, la realización de caracterización biomecánica y estudios *in vivo*, que permitan evaluar su potencial aplicación quirúrgica.

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES DEL TEJIDO CARTILAGINOSO.

1.1 Definición y función del tejido cartilaginoso.

El cartílago es un tipo de tejido conectivo especializado y esqueletógeno, compuesto de una población celular condrogénica y abundante matriz extracelular (MEC). Este tejido tiene la particularidad de no contener vasos sanguíneos, linfáticos, ni nervios y puede estar rodeado de un tejido conectivo denso denominado pericondrio. En general, la nutrición de los condrocitos se realiza por difusión tisular de sustancias nutritivas a través de los poros de la matriz extracelular desde los capilares sanguíneos adyacentes. Sin embargo, el mecanismo de nutrición y las necesidades metabólicas varían dependiendo de la variedad de tejido cartilaginoso. En el caso del cartílago rodeado por pericondrio (como el cartílago elástico y el cartílago hialino no articular), la nutrición se ve favorecida por este, debido a la vascularización de los tejidos adyacentes. Mientras que en el caso del cartílago articular, la nutrición proviene principalmente del líquido sinovial que se encuentra en las cavidades articulares [1, 2] (Fig.1).

El gran contenido líquido de la MEC favorece al transporte de gases, sustancias nutritivas y productos de desecho. Esta difusión se dificulta a medida que la matriz madura y se hace más densa. Debido a que la nutrición del tejido cartilaginoso se lleva a cabo mediante difusión, existe una limitación del espesor del tejido para poder mantener la población celular que se encuentra más interna. Además, junto a la nutrición por difusión y la carencia de vasos sanguíneos y linfáticos, trae como consecuencia, que el

tejido cartilaginoso sea un tejido de lenta y difícil regeneración [3]. Esta lenta regeneración del tejido cartilaginoso explica la existencia del gran número y la severidad de las lesiones que afectan a este tipo de tejidos.

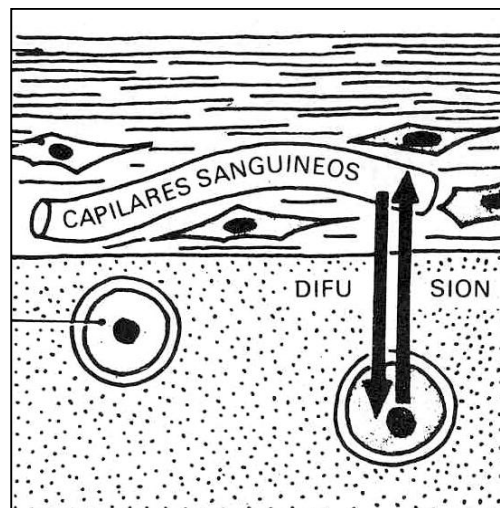


Fig.1 Imagen esquemática representando el proceso de nutrición del tejido cartilaginoso (modificado de Poirier, 1978) [4].

Como se mencionó anteriormente, el cartílago es un tejido especializado y esquelético, cuya función principal es dar soporte y estabilidad estructural a los tejidos y órganos en los cuales está presente. Además, el tejido cartilaginoso cumple con la función de revestimiento cuando se encuentra en las superficies articulares, evitando su fricción, absorbiendo el impacto y distribuyendo la carga [5].

El tejido cartilaginoso tiene un rol esencial en la formación del esqueleto, ya que la mayor parte del mismo se forma a partir de un cartílago hialino preexistente, el cual es reemplazado progresivamente por tejido óseo, en un proceso denominado osificación endocondral. [3]. En la etapa post natal, el tejido cartilaginoso interviene activamente en el proceso de osificación y crecimiento de las estructuras óseas, como el caso del

crecimiento longitudinal de los huesos largos. En el esqueleto adulto, el tejido cartilaginoso solo está presente como cartílago articular y costal, pero también forma un armazón rígido para dar soporte a algunas estructuras viscerales (las vías aéreas) pabellón articular [3], nariz, discos intervertebrales, sínfisis del pubis.

1.2 Histogénesis del tejido cartilaginoso.

Para poder comprender la compleja estructura histológica, molecular y regenerativa del tejido cartilaginoso, es necesario estudiar su origen embriológico.

Durante el desarrollo embrionario, ocurren diferentes fases que conllevan a la formación completa del feto. Una vez ocurrida la fertilización, se da inicio a la formación del embrión que estará compuesto por dos células. Al tercer día de la fecundación, este embrión ya está conformado por ocho células totipotentes y que mediante división mitótica llegaran a dieciséis células o blastómeros, dando inicio a una nueva fase de desarrollo embrionario, la etapa de mórula [6]. Las dieciséis células que conforman la mórula se organizan conformando una capa celular externa, denominada trofoblasto, y una cavidad interna o blastocele, así como la masa celular interna que se denomina blástula o blastocito. Posteriormente, y a partir de la tercera semana de desarrollo embrionario, ocurre otra fase de desarrollo denominada gastrulación. La gastrulación se caracteriza por la formación de la gástrula, en la cual y a partir de las capas germinales (epiblasto e hipoblasto) se diferenciarán las tres hojas germinales, originando el embrión trilaminar. Este embrión está compuesto por el ectodermo, mesodermo y endodermo, que son las tres hojas o capas germinales que darán origen a todos los tejidos y órganos del organismo [6] (Fig.2).

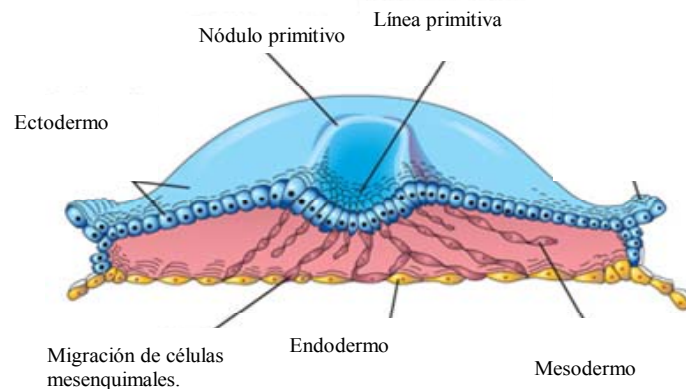


Fig.2 Imagen esquemática de las capas blastoméricas: Ectodermo, mesodermo, endodermo. (modificado de: Moore, Keith L. et al., 2013) [7].

Cada hoja germinal dará origen a una serie de tejidos y órganos. En el caso del ectodermo que es la capa más externa del embrión, dará origen a tejidos como la capa externa de la piel, la cavidad oral, el epitelio de los órganos sensoriales. Además, se originan otras estructuras como el tubo y cresta neural que darán origen a la formación del sistema nervioso central y sistema nervioso periférico [6].

Es importante destacar, que en la zona del esqueleto facial tema de especial interés en esta Tesis Doctoral, el tejido cartilaginoso existente deriva de la cresta neural, la cual se forma a partir del ectodermo durante la neurulación [3].

La capa intermedia del embrión es el mesodermo y de esta capa se deriva el tejido conectivo propiamente dicho y los tejidos conectivos especializados como el tejido cartilaginoso, el tejido óseo, la sangre y el tejido adiposo. Además del tejido conectivo, existen otros sistemas que se derivan del mesodermo como el sistema cardiovascular, el sistema musculoesquelético, sistema urinario, sistema reproductor, etc. [6] (Fig.3) .

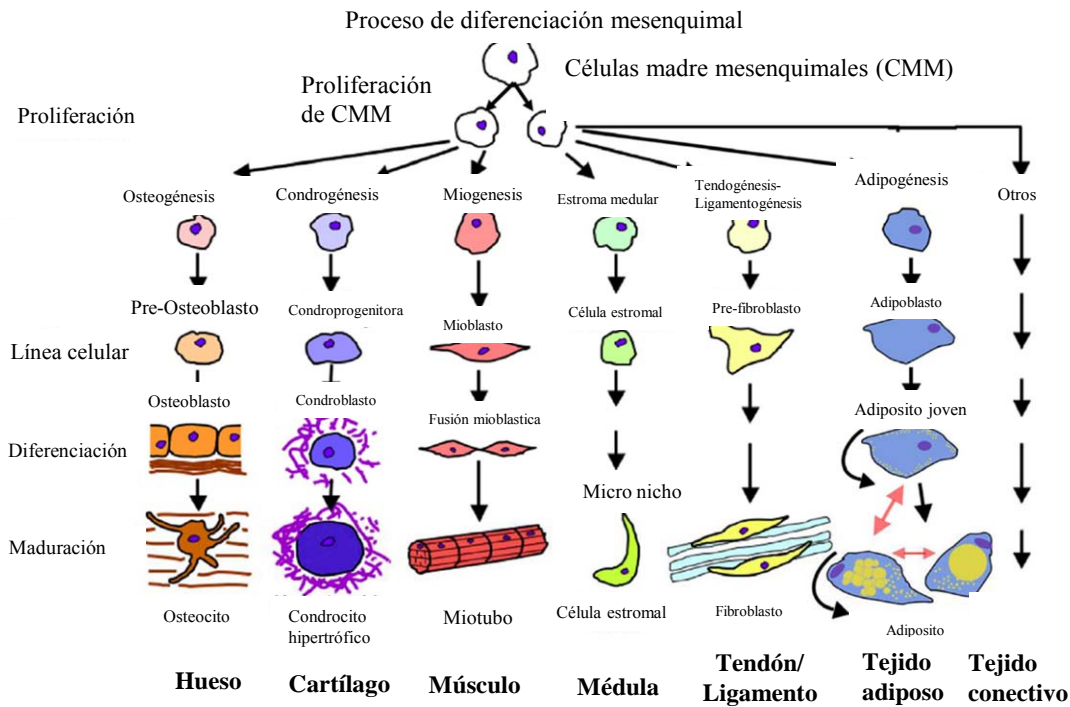


Fig.3 Imagen esquemática de la diferenciación de las células madre mesenquimales. (modificado de Di Marino, Amy et al., 2013) [8].

Con respecto a la capa más interna del embrión trilaminar denominada endodermo, cabe señalar que de esta capa se originan la mayoría de los órganos internos como es el caso del sistema digestivo, sistema respiratorio, las glándulas endocrinas y el hígado [6]. Los tejidos derivados de cada hoja germinal se observan a continuación (Fig.4).

Ectodermo	Mesodermo	Endodermo
Sistema nervioso central y periférico.	Tejido conectivo: Cartílago.	Epitelio del tubo digestivo.
Sistema nervioso periférico.	Huesos.	Árbol respiratorio.
Oído.	Sangre.	Parénquima de amígdalas.
Nariz.	Corazón.	Tiroides.
Epitelio ocular.	Vasos sanguíneos.	Paratiroides.
Epidermis.	Músculo estriado y liso.	Timo.
Esmalte dental.	Riñón.	Hígado.
Hipófisis.	Gónadas.	Páncreas.
Glándulas mamarias.	Bazo.	Epitelio de vejiga.
Glándulas subcutáneas.	Corteza de glándula suprarrenal.	Uretra.
Esqueleto facial.	Mesotelio.	Epitelio del tímpano y trompa de Eustaquio.

Fig.4 Esquema representando los tejidos y órganos derivados de cada capa germinal.

En relación a la formación del tejido cartilaginoso cabe señalar que durante la quinta y sexta semana de embriogénesis se produce una condensación mesenquimal a partir de las células madre mesenquimales [3]. En esta condensación, las células mesenquimales indiferenciadas se mueven, incrementan su área pero no proliferan, resultando un cúmulo de células [9, 10]. Es a partir de esta estructura, en la cual las células retraen sus prolongaciones citoplasmáticas y se congregan en masa formando los centros de condricificación [11].

Posteriormente, las células experimentan un proceso de diferenciación de células madre mesenquimales a células condroprogenitoras. Este proceso es mediado por la intervención de factores como la proteína morfogenética ósea (BMP2) y el factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF5), entre otros [12]. Además, este proceso está acompañado por un incremento en la expresión de *Sox9* [13]. Estas células mesenquimales condroprogenitoras, aumentan su tamaño y comienzan a secretar sustancia fundamental y tropocolágeno, para formar fibras de colágeno. A medida que aumenta esta matriz, se hace más consistente y elástica en la cual las células se ubican en lagunas y gradualmente se diferencian a células maduras o condrocitos, al mismo tiempo, y alrededor de este tejido se forma el pericondrio. Este es un tejido conectivo también de origen mesenquimal constituido por células aplanadas, MEC y vasos sanguíneos [3].

En el pericondrio, también se encuentran las células condroprogenitoras y condroblastos. El pericondrio se forma entre la quinta y sexta semana de desarrollo embriológico al mismo tiempo que el cartílago [3]. Es una capa de tejido conectivo denso irregular que rodea al tejido cartilaginoso, pero se encuentra ausente en el cartílago articular, de crecimiento y en el fibrocartílago.

El pericondrio se compone de dos capas, una capa externa o fibrosa formada por tejido conectivo fibroso, fibroblastos y fibras colágenas tipo I, esta capa se encuentra adya-

cente a los vasos sanguíneos del tejido conectivo circundante con el cual se fusiona, y una capa interna celular o condrógena, donde se encuentran las células condrogénicas y los condroblastos, que al diferenciarse darán origen a los condrocitos, sin embargo, esta capa se funde con la MEC con lo cual en ocasiones no se observa muy definida [2] (Fig.5).

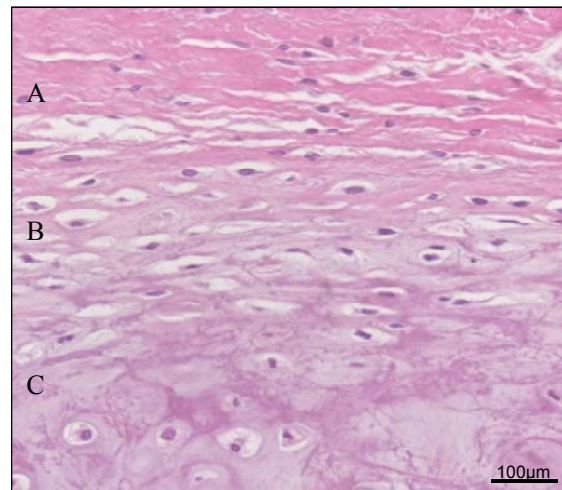


Fig.5 Histología del pericondrio. Corte histológico de cartílago hialino teñido con Hematoxilina-Eosina, donde se observa la capa externa A) y la capa interna B) del pericondrio. Además, se observa la MEC del tejido cartilaginoso y su componente celular C). Magnificación 40X. Imagen del Departamento de Histología de la Universidad de Granada.

1.3 Crecimiento y desarrollo del tejido cartilaginoso.

Una vez diferenciadas las células mesenquimales en células productoras de tejido cartilaginoso, comienza un complejo proceso de desarrollo del tejido cartilaginoso. Este tejido posee la capacidad de crecimiento y remodelación presentando importantes variaciones a lo largo de la vida. En este sentido, podemos decir que el desarrollo del tejido cartilaginoso se produce mediante dos tipos de crecimiento, el crecimiento intersticial y el crecimiento aposicional [2].

1.3.1 Crecimiento intersticial o interno del cartílago.

El crecimiento intersticial o también conocido como crecimiento interno, es característico del tejido cartilaginoso esquelético el cual se inicia en el centro de condricificación, a partir del cual, el cartílago va incrementando sus dimensiones mediante divisiones mitóticas de los condroblastos (Fig.6A). Además, del incremento en el número de células, estas junto a las divisiones mitóticas dan origen a la formación de un grupo de células. A este grupo de células originadas del mismo condrocito se les denomina grupo isogénico [3]. El crecimiento intersticial, es un crecimiento donde la división de condrocitos y secreción de nueva matriz da lugar a la expansión del cartílago desde el interior y solo se produce en cartílago en desarrollo. Con este tipo de crecimiento los condrocitos pueden adoptar dos disposiciones en la MEC, una primera disposición alineándose en forma similar a una pila de monedas, que se denomina grupo isogénico axial (Fig.6A), y una segunda disposición en la cual los condrocitos se agrupan de manera esférica formando los denominados grupos isogénicos coronarios (Fig.6B).

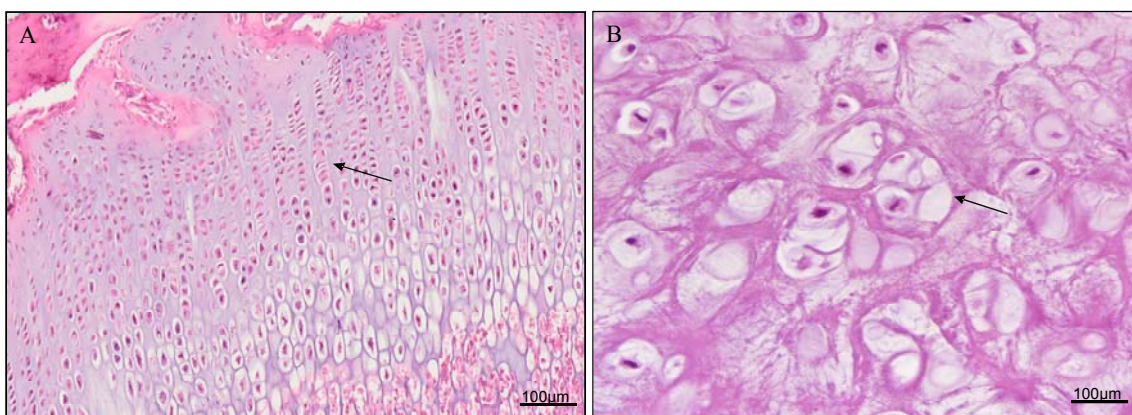


Fig6 A) Imagen de corte histológico tinción H-E representando el crecimiento intersticial de cartílago hialino en desarrollo de la metafisis de hueso largo En este crecimiento se observan los característicos los grupos isogénicos axiales (flecha negra) que permiten la elongación del hueso. Magnificación 5X. B) Grupos isogénicos coronarios (flecha negra) en MEC de cartílago elástico. Magnificación 40X Imágenes del Departamento de Histología de la Universidad de Granada.

1.3.2 Crecimiento aposicional o exógeno

El crecimiento aposicional es un tipo de crecimiento característico del cartílago que se encuentra rodeado por pericondrio (Fig.7). Este tipo de crecimiento ocurre en la etapa fetal, y continúa de forma gradual durante la infancia y hasta la pubertad período en el cual se define su estructura

A partir de las células condrógenas localizadas en la capa interna del pericondrio, se produce la diferenciación de estas a condroblastos. Estos condroblastos van sintetizando la MEC hacia el interior del tejido [3], esta progresiva secreción de matriz y la diferenciación de los condroblastos a condrocitos al momento de quedar incluidos en la matriz, permiten el aumento del tamaño del cartílago, tanto en diámetro como en longitud. Este crecimiento se produce en el cartílago que conforma el esqueleto visceral y otros tipos de tejido cartilaginoso, como el pabellón auricular (cartílago elástico) y el cartílago costal (cartílago hialino).

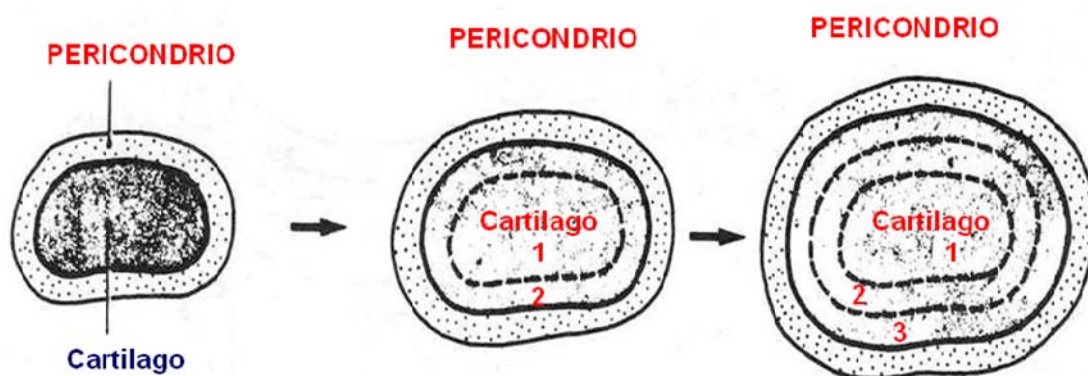


Fig.7 Imagen esquemática representando el crecimiento intersticial del tejido cartilaginoso a partir del pericondrio (modificado de Poirier, 1978) [4].

2. COMPOSICIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO CARTILAGINOSO.

Histológicamente, el tejido cartilaginoso está compuesto por una población condrogénica o condrocitos, que se encuentra inmersa en una MEC altamente especializada (Fig.8). Las células presentes en el tejido cartilaginoso cumplen diversas funciones, siendo su principal función la síntesis de MEC. En el interior de la MEC estas células interactúan con otras, pero principalmente con el medio extracelular y la MEC. Una característica importante de las células presentes en el tejido cartilaginoso es llevar a cabo un mecanismo de adhesión de las células a la MEC para poder mantener la organización del tejido y contribuir a su estabilidad mecánica [2].

Por otra parte, la MEC posee múltiples funciones las cuales son indispensables para el correcto funcionamiento del tejido cartilaginoso. Una de las funciones de la MEC es que interviene en los procesos de adhesión celular, la comunicación entre células, y la diferenciación de las mismas [14]. Además, provee soporte estructural y biomecánico al tejido y a las células que lo componen [15]. Por otra parte, la MEC en el tejido cartilaginoso interactúa con las células, regulando procesos biológicos, como la homeostasis, la reparación, el crecimiento celular, así como su diferenciación y su supervivencia [16].

En general la MEC del tejido conectivo posee un componente fibrilar y un componente no fibrilar. El componente fibrilar está conformado por distintos tipos de fibras como las fibras de colágeno, las fibras elásticas y las fibras reticulares (estas últimas no se

encuentran en el tejido cartilaginoso). El componente no fibrilar está compuesto por glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos y glicoproteínas.

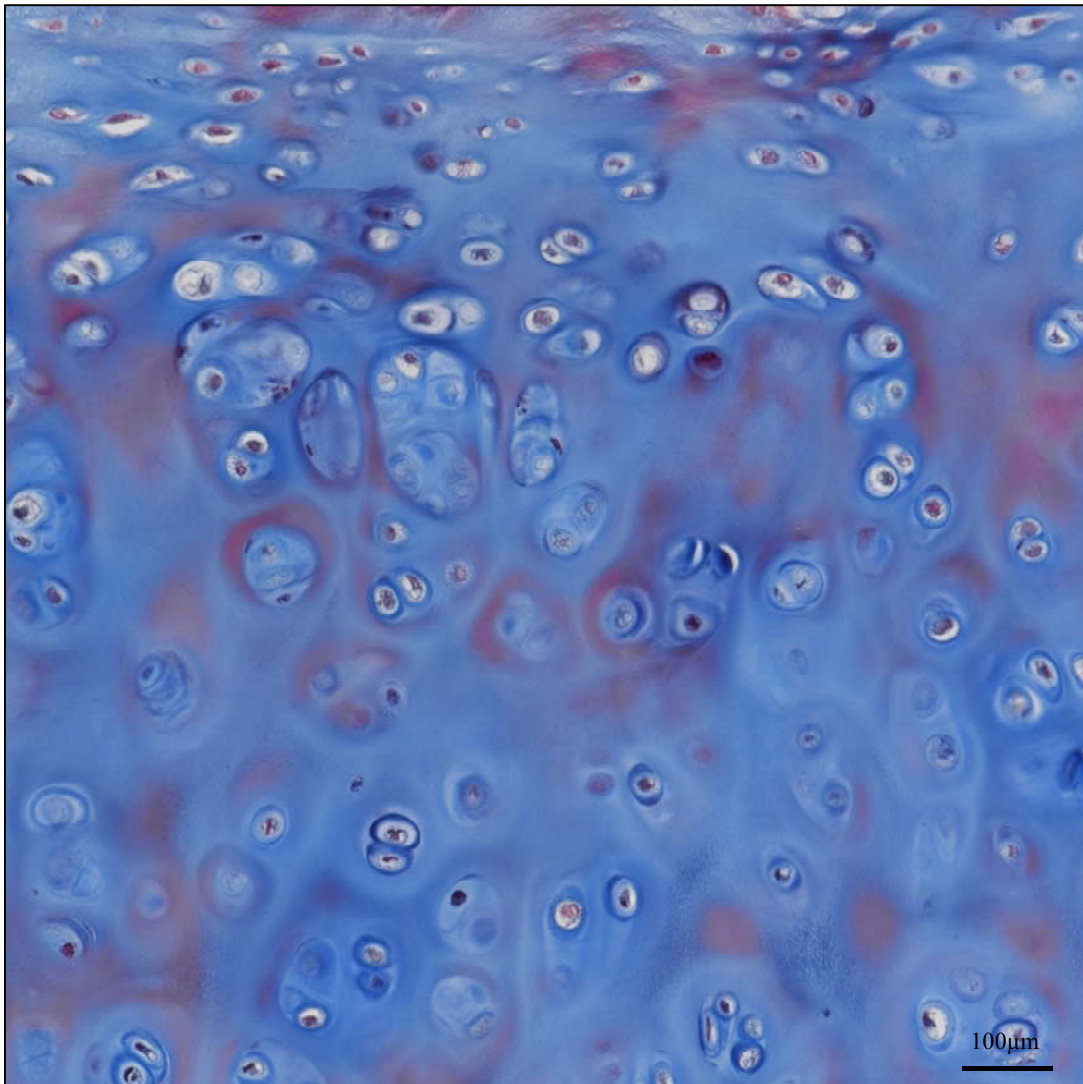


Fig.8 Imagen representativa de la composición del tejido cartilaginoso donde se observan las células inmersas en la MEC. Corte histológico de cartílago hialino. Tinción Tricrómico de Masson. Magnificación 20X. Imagen del Departamento de Histología. Universidad de Granada.

A continuación en esta Tesis Doctoral se describirán las células, así como cada uno de los componentes de la MEC del tejido cartilaginoso.

2.1 Células

El tejido cartilaginoso está compuesto por una población celular condrogénica, en la cual se distinguen tres tipos de células, las condrógenas o condroprogenitoras, los condroblastos y los condrocitos.

Las células condrógenas o condroprogenitoras:

Son las que derivan de las células madre mesenquimales. Desde el punto de vista morfológico, son estrechas en forma de huso y escaso citoplasma. Estas células poseen un aparato de Golgi pequeño, escasas mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso desarrollado y ribosomas libres. Estas células generalmente se pueden diferenciar en condroblastos, sin embargo y en algunas circunstancias, estas células pueden diferenciarse en células osteoprogenitoras [17].

Los condroblastos:

Estos derivan de las células condroprogenitoras dentro del centro de condricación, y de las células condrógenas ubicadas en la capa interna del pericondrio. El condroblasto presenta un citoplasma basófilo, pero a medida que madura va perdiendo la basofilia y se torna acidófilo. Posee un retículo endoplasmático rugoso abundante, aparato de Golgi desarrollado, múltiples mitocondrias y vesículas secretoras [17]. La principal función de esta célula es la síntesis de MEC hacia el interior de la matriz cartilaginosa. Además los condroblastos son células pequeñas que comienzan a sintetizar una cápsula en desarrollo. Cuando están a nivel del pericondrio, se ubican en lagunas ovales, y adoptan una morfología aplanadas y paralelas a la superficie [3].

Los condrocitos:

Estas células corresponden a la diferenciación de los condroblastos, que a medida que secretan MEC cartilaginosa van quedando completamente inmersos en ella, siendo esta una característica importante de este tipo de células. Además, estas células culminan la síntesis de la cápsula pericelular y formación de una laguna (Fig.9), lo que los diferencia de los condroblastos [17]. Cuando los condrocitos se ubican en la periferia, tienen un aspecto ovoide y aplanado paralelo a la superficie, y cuando se ubican en zonas más profundas son redondeados. Estas células miden aproximadamente entre 10 a 30 μm presentando un núcleo grande y nucléolo prominente. Los condrocitos jóvenes tienen abundantes mitocondrias, un retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi bien desarrollado y además presentan gránulos de glucógeno y lípidos que sirven de reserva energética, además, sintetizan principalmente colágeno II y agregano, que son las principales moléculas de la MEC cartilaginosa [18]. Otra característica de los condrocitos, es que poseen un desarrollado citoesqueleto y filamentos de actina y vimentina, los cuales podrían contribuir en sus propiedades biomecánicas [19].

Cabe destacar, que el tejido cartilaginoso sufre cambios importantes en cuanto al número de su población celular a lo largo del desarrollo humano. El cartílago embrionario se caracteriza por su alto contenido celular, pero con el proceso de envejecimiento el porcentaje celular disminuye considerablemente, llegando a representar solamente del 2% al 10% del volumen tisular total del tejido adulto [20].

2.2 Matriz extracelular

Los diferentes tipos de células presentes en el tejido cartilaginoso se encuentran inmersas en una MEC especializada (Fig.9). La MEC es una red compleja de macromoléculas autoensambladas producidas por las células, que otorgan soporte estructural. Además, muchas moléculas de la MEC pueden regular diversos procesos celulares debido a que actúa como reservorio para factores de crecimiento y citoquinas [21].

La MEC cartilaginosa está compuesta aproximadamente por un 70% de agua en forma de gel coloidal firme que cumple un rol fundamental en la nutrición del tejido cartilaginoso, a través del cual se produce la difusión de nutrientes y gases [3]. El resto de los componentes son moléculas sólidas 20%-30%. Dentro de este porcentaje de composición sólida el 60% corresponde a colágeno, 30% proteoglicanos y 10% otras moléculas [17]. La MEC es acidófila cerca del pericondrio y se torna basófila a medida que se profundiza en el tejido. Esta basofilia es muy marcada alrededor de cada laguna en la denominada matriz territorial, y es menos basófila en la MEC localizada entre las lagunas, en la denominada matriz interterritorial [3].

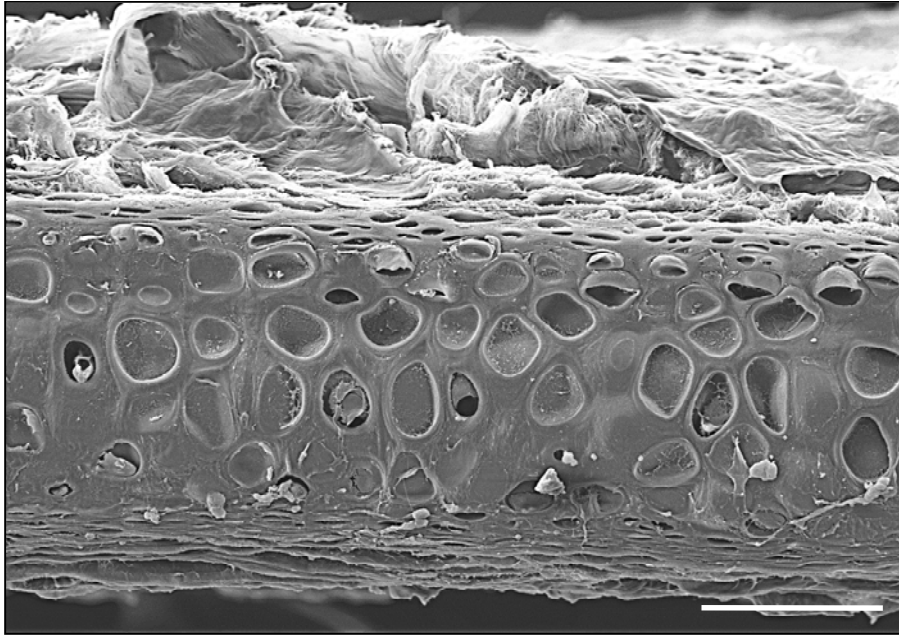


Fig.9 Aspecto estructural del tejido cartilaginoso por microscopio electrónico de barrido mostrando los diversos componentes del tejido: Pericondrio, cápsulas, lagunas, células y MEC. Magnificación 400X. Barra calibradora 200 μ m. Imagen del Departamento de Histología. Universidad de Granada.

La MEC del tejido cartilaginoso presenta características específicas que están en estrecha relación con sus células y su función. En el tejido cartilaginoso, la MEC se organiza distinguiendo topográficamente tres zonas: La cápsula o zona pericelular, la matriz territorial y la matriz interterritorial (Fig.10A).

Cápsula o zona pericelular:

Es una región estrecha de matriz territorial que rodea la lámina basal y está en contacto directo con los condrocitos [17] (Fig.10B-10C). Es un complejo macromolecular que contiene proteoglicanos sulfatados como el biglicano, hialuronato, además de glicoproteínas y proteínas no colágenas como las moléculas de adhesión fibronectina, laminina y colágeno tipo VI [5, 22]. Su función no está esclarecida pero se cree que sirve como transductor de señales biomecánicas y bioquímicas para el condrocito [23-25], jugando un rol en la transducción inicial cuando el cartílago es sometido a cargas [26].

Matriz o zona territorial:

Esta zona corresponde a la MEC que rodea a cada una de las lagunas y se relaciona con la cápsula. Esta zona presenta fibras y sustancia fundamental, con un predominio importante de proteoglicanos, principalmente condroitín sulfato. Debido a esto, esta zona presenta una marcada basofilia [27, 28]. Se cree que esta matriz protege a los condrocitos del estrés mecánico y contribuye a la resiliencia del cartílago, pero además, permite la difusión de nutrientes para el condrocito.

Matriz o zona interterritorial:

Es la zona de la MEC que está entre los grupos isogénicos y condrocitos aislados. Esta es la zona de mayor superficie y es la responsable de la mayoría de las propiedades mecánicas del cartílago [29]. Se diferencia de la matriz territorial en su localización y composición. La matriz interterritorial tiene abundantes fibras colágenas y una menor cantidad de proteoglicanos [17].

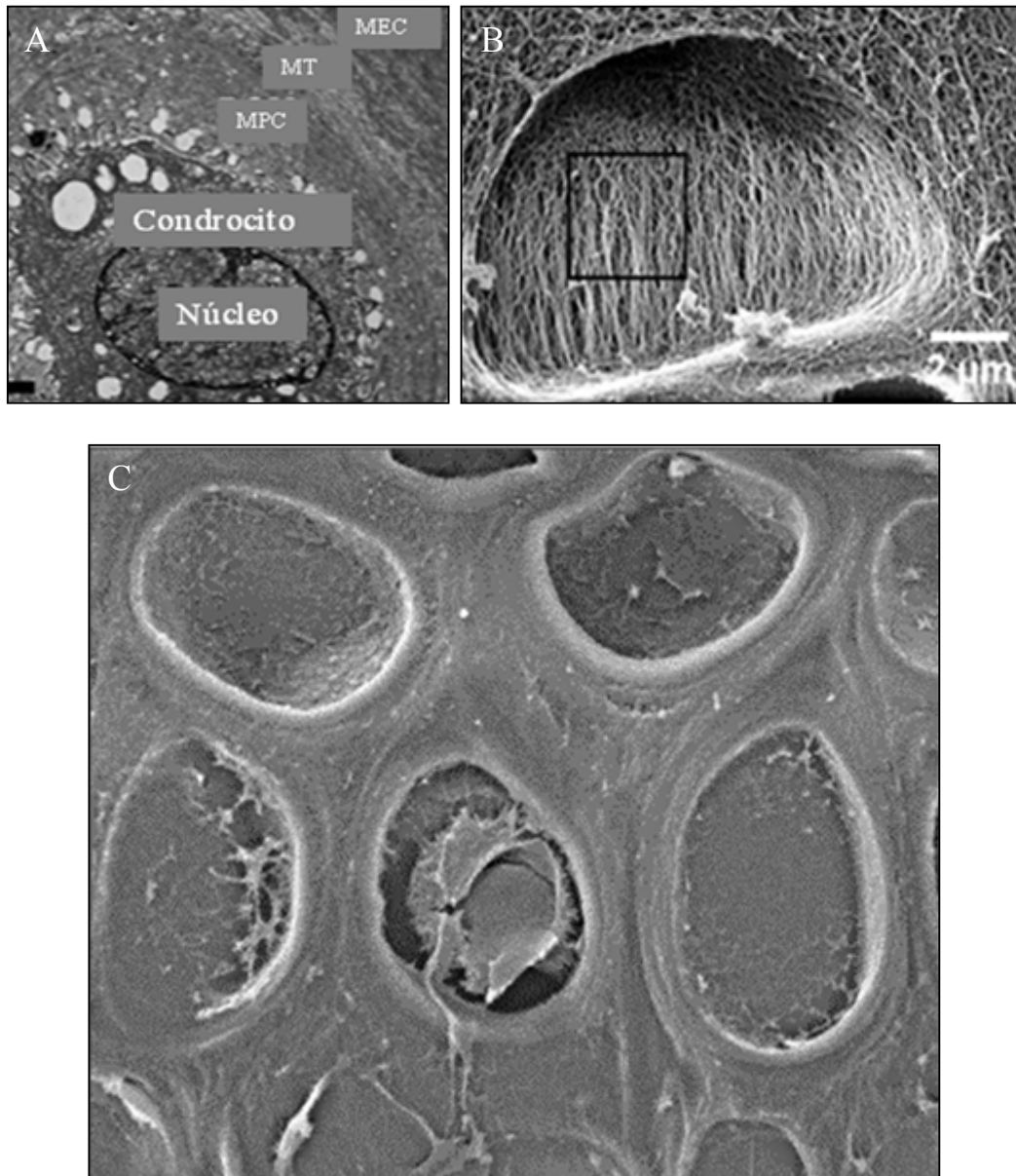


Fig.10 Imagen de microscopio electrónico de trasmisión. A) Se observa un condrocito rodeado de la matriz extracelular (MEC), en el que se aprecian zonas de matriz pericelular (MPC) y de matriz territorial (MT). B) Cápsula pericelular a mayor aumento (imágenes A y B modificadas de: Wilusz Rebecca E et al., 2014) [25]. C) Se observan las lagunas de los condrocitos, rodeadas por la cápsula pericelular. Imagen del Departamento de Histología. Universidad de Granada.

2.2.1 Componente fibrilar

El componente fibrilar de la MEC está compuesto por tres tipos fundamentales de fibras, las fibras colágenas, las fibras elásticas y las fibras reticulares. Cabe destacar, que en la MEC del tejido cartilaginoso no se encuentran las fibras reticulares, sin embargo,

estas serán brevemente descritas ya que forman parte de la MEC de los tejidos conectivos.

Fibras colágenas:

Estas son las fibras más abundantes en la MEC del organismo. El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano [11] siendo el principal componente fibrilar de la MEC, dicha proteína, se entrecruza con los agregados de proteoglicanos [30] y otras proteínas constitutivas de la MEC como veremos a continuación.

El colágeno es una proteína constituida por tres cadenas polipépticas (cadenas α), compuestas por los aminoácidos prolina, lisina, hidroxiprolina [31]. En cada molécula de colágeno las tres cadenas se enroscan entre sí formando una estructura en soga (esta estructura la hace resistente a la degradación enzimática), que se estabiliza mediante puentes de hidrógeno en la glicina y uniones covalentes determinados por la hidroxilisina [32]. El colágeno es sintetizado como procolágeno por los condrocitos y una vez es transcrito en mRNA para las cadenas α , pasa al retículo endoplasmático rugoso y luego al aparato de Golgi, donde se produce la glicosilación de radicales y se forma la triple hélice. Estas proteínas se ensamblan en las vesículas de transporte y principalmente nivel extracelular. Durante el proceso de remodelación de la MEC, el colágeno es degradado mediante la acción de las metaloproteasas y colagenasas, rompiendo las cadenas en segmentos [20].

En la actualidad se han identificado 28 tipos de colágeno en humanos [33], siendo el colágeno tipo II (90-95%) en su variante IIa y IIb, el más abundante y representativo del tejido cartilaginoso [19] (Fig.11A). Sin embargo, otros tipos de colágeno se encuentran en cantidad variable en el tejido cartilaginoso, siendo el tipo I, IV, V, VI, IX, XI los que

están presentes y ayudan a estabilizar la red de fibras colágenas [3, 5]. En el caso del fibrocartilago, el colágeno tipo I es el predominante (Fig.11B).

La principal función de las fibras colágenas es resistir a las fuerzas de tensión, compresión y estabilizar a la MEC [32, 34].

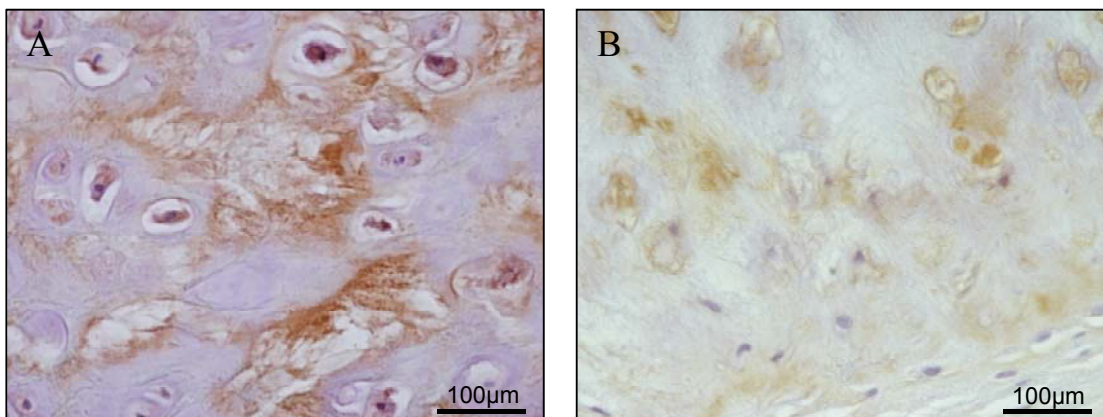


Fig.11 Imagen de corte histológico de cartilago elástico donde se identifican fibras de colágeno mediante técnica inmunohistoquímica. A) Colágeno II B) Colágeno I Magnificación 40X. Imagen del Departamento de Histología. Universidad de Granada.

Fibras elásticas.

Estas son las fibras más abundantes en el cartilago elástico. Las fibras elásticas son un tipo de fibra cuyo componente principal es la proteína elastina. Esta molécula es resistente a la mayor parte de las enzimas. Las fibras elásticas se encuentran inmersas en la sustancia fundamental, y se observan como filamentos alargados, que varían entre 1 a 4 µm de diámetro y en algunos ligamentos pueden alcanzar de 10 a 12 µm [2, 11]. Cada fibra elástica está compuesta de múltiples microfibrillas con diámetro entre 10-12 nm, que rodean un material amorfo. Este material amorfo es la elastina y las microfibrillas que lo rodean están compuestas por diversas glicoproteínas, incluyendo la fibrilina [11]. Estas microfibrillas que rodean a la elastina se disponen en diversas direcciones y la dirección que adoptan va a depender del sentido del estiramiento de las

fibras elásticas del tejido [30]. La organización de las fibras elásticas puede variar dependiendo del tejido o del individuo, se pueden presentar en forma de fibras elásticas individuales, en forma de haces o como láminas [35]. Esta organización en forma de fibras o de láminas influye en la resiliencia y las propiedades biomecánicas de los tejidos [30].

En este contexto, las fibras elásticas se pueden identificar mediante técnicas histoquímicas como fucsina resorcina, fucsina aldheídica , Verhoeff (Fig.12A) y la tinción de orceína (Fig.12B) [2, 36]. Cabe resaltar, que la técnica de orceína fue la elegida para identificar las fibras elásticas en la presente Tesis Doctoral.

La síntesis de las fibras elásticas, se produce inicialmente al momento de que la célula, ya sea un fibroblasto, condroblasto o una célula muscular lisa de los vasos sanguíneos, sintetiza una molécula de proelastina. Esta se polimeriza una vez entra en el espacio intercelular, y se forma la elastina. La elastina contiene los aminoácidos desmosina y isodesmosina formados por enlaces covalentes entre residuos de lisina, y se cree que este tipo de enlaces son los responsables de la elasticidad de la proteína elastina [11], la cual permite que una fibra elástica pueda someterse a tensión y regresar a su longitud inicial luego de eliminada la misma.

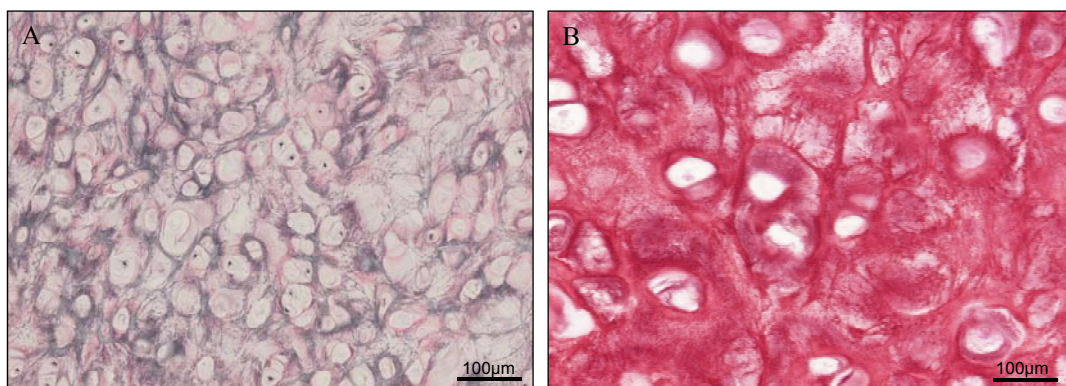


Fig.12 Imagen de corte histológico de cartilago elástico donde se observan las fibras elásticas. A) Tinción de Verhoeff Magnificación 20X. B) Tinción de Orceína. Magnificación 40X. Imagen Departamento de Histología. Universidad de Granada.

En el cartílago elástico, estas fibras se disponen en forma de red y se ubican en las zonas profundas de la MEC, principalmente en la matriz territorial, desde donde se disponen hacia otros condrocitos y grupos isogénicos atravesando la matriz interterritorial. A nivel del pericondrio estas fibras son menos abundantes [2].

Fibras reticulares:

Es importante señalar que las fibras reticulares no se encuentran en la MEC del tejido cartilaginoso. Estas fibras se caracterizan por ser finas y ramificadas, además, dan soporte en distintos órganos, como el riñón, bazo, hígado órganos linfáticos. Las fibras reticulares forman una red característica y está compuesta por fibras colágenas tipo III, V en combinación con abundantes glicoproteínas. Estas últimas, permiten su identificación con el método PAS y técnicas de impregnación argéntica [11, 30, 37, 38].

En la Fig.13 se representa un cuadro comparativo de los tres distintos tipos de fibras que componen la MEC de los tejidos conectivos, observándose las fibras colágenas, las fibras reticulares y las fibras elásticas.

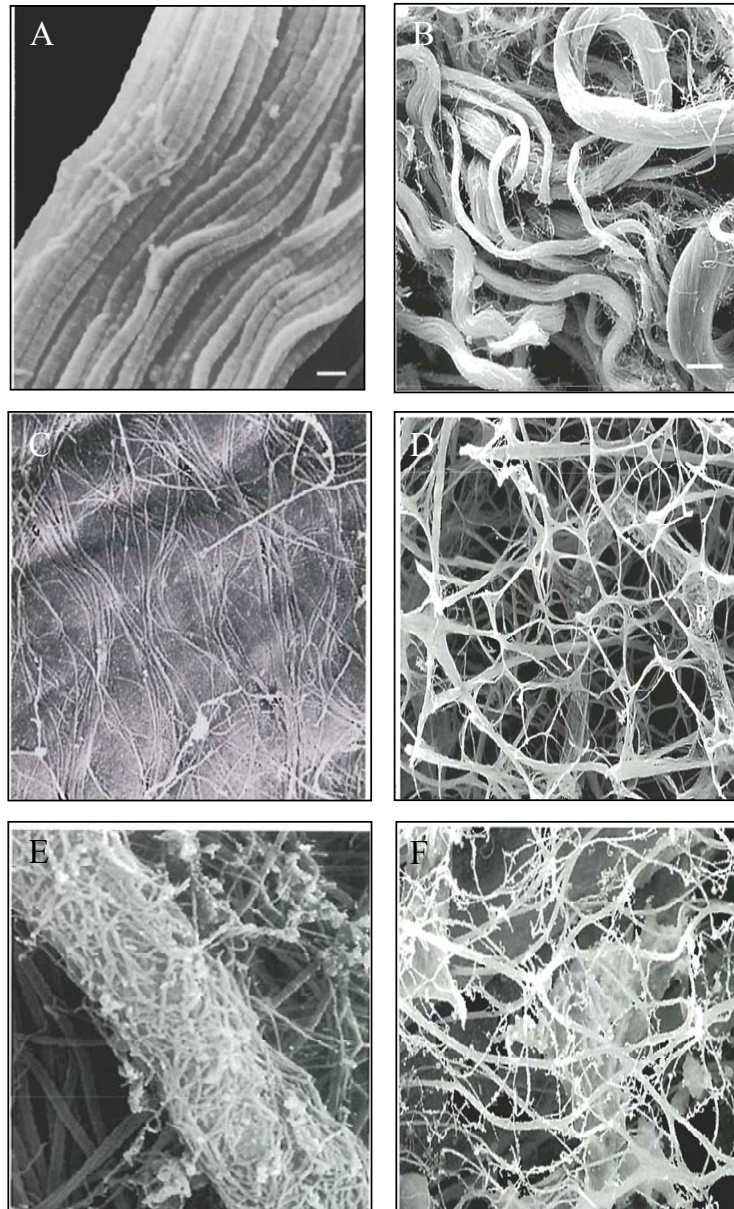


Fig.13 Imagen representativa de las fibras que componen la MEC mediante la utilización de microscopía electrónica de barrido (SEM). A) Fibra colágena. Se observa su organización tridimensional y formando un haz. Barra calibradora 100nm. B) Red de fibras colágenas. Barra calibradora 5µm. C) Fibras reticulares. Se observa que estas fibras colágenas son más delgadas y forman haces más pequeños. D) Red de fibras reticulares. E) Fibras elásticas. La fibra elástica se observa cubierta de microfibrillas. F) Red de fibras elásticas y fibrillas (todas las imágenes de este panel han sido modificadas de: Ushiki Tatsuo, 2002) [30].

En la presente Tesis Doctoral, la red de fibras colágenas tipo I y tipo II, así como las fibras elásticas, han sido motivo de estudio debido a su importancia y al gran porcentaje que representan estas fibras en la MEC del cartílago elástico.

2.2.2 Componente no Fibrilar

En el componente no fibrilar de la MEC lo integran diversas moléculas, las cuales están inmersas en una sustancia fundamental. La sustancia fundamental es clara, viscosa y está compuesta principalmente por agua, además de GAGs, proteoglicanos y glicoproteínas. La sustancia fundamental representa aproximadamente el 80% de la composición del cartílago y ocupa el espacio entre las células y fibras, funcionando como el medio para difundir el líquido tisular que contiene tanto iones orgánicos de sodio, calcio, cloro y potasio y los nutrientes como los productos de desecho [2, 39]. Con respecto a los proteoglicanos, se puede decir que estos se encuentran dispuestos en forma de agregados, que le otorgan la consistencia sólida y flexible al cartílago. Los principales GAGs presentes en la sustancia fundamental son el ácido hialurónico, el condroitín sulfato, el dermatán sulfato, el queratán sulfato y el heparán sulfato, todos estos GAGs son sulfatados, a excepción del ácido hialurónico [2]. Los GAGs son carbohidratos hidrofílicos, que se unen formando disacáridos, y estos a su vez se unen formando largas cadenas. Se encuentran en la superficie celular y como componentes de la MEC. Los GAGs sulfatados son sintetizados en el complejo de Golgi, sin embargo el ácido hialurónico (no sulfatado) es sintetizado por las proteínas transmembrana llamadas HA sintasas [40].

Los GAGs están cargados negativamente, por lo cual atraen iones de Na^+ acumulando gran cantidad de agua en su estructura [41]. La naturaleza hidrofílica de los GAGs es la que hace a la MEC resistente a las fuerzas de compresión. La cantidad de GAGs en la matriz depende del tipo de tejido, la edad y el microambiente [41]. Estos GAGs se unen a una proteína central y constituyen a los proteoglicanos[41].

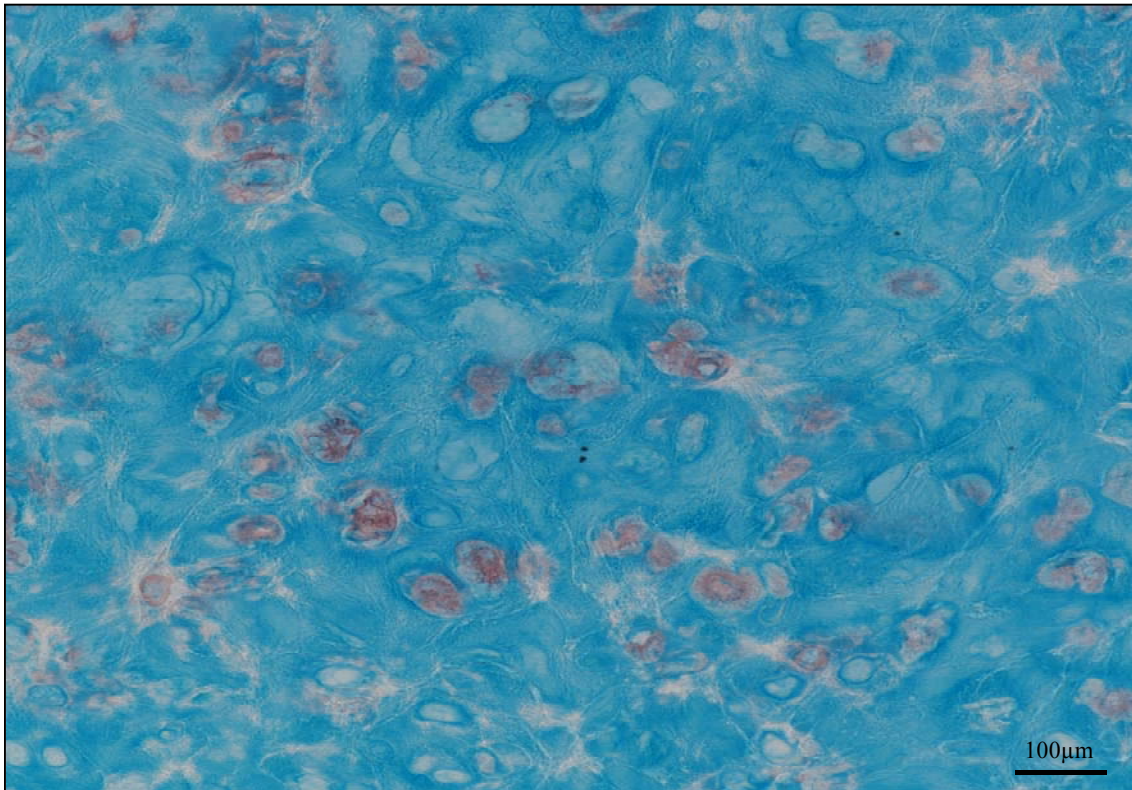


Fig.14 Imagen de corte histológico de cartilago elástico. Tinción Azul Alcian para la demostración de proteoglicanos sulfatados. Magnificación 20X. Imagen del Departamento de Histología. Universidad de Granada.

Los proteoglicanos son macromoléculas compuestas por una proteína central a la cual se unen covalentemente los GAGs (Fig.14). La característica principal de los proteoglicanos viene dada por las características físico-químicas de los GAGs, ya que le proporcionan hidratación y resistencia a la compresión [42]. Además, regulan el mantenimiento de la MEC, participando también en la proliferación celular mediante interacciones con factores de crecimiento [43].

El tejido cartilaginoso se caracteriza por su alta proporción de proteoglicanos de distintos tipos, los cuales son esenciales para su normal funcionamiento. Entre los proteoglicanos que destacan son los de superficie celular (sindecan y glipican), pequeños proteoglicanos ricos en leucina (decorina, biglican, fibromodulin) los cuales se caracterizan por interactuar con el colágeno, y proteoglicano de membrana basal

(perlecan) [41]. Además, de acuerdo a su tamaño, estas moléculas se dividen en dos grupos, los grandes proteoglicanos, y pequeños proteoglicanos [44].

Los pequeños proteoglicanos son también llamados pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRPs). Estos proteoglicanos pequeños se componen de una proteína central rica en leucina [44] unidas a una o dos cadenas de condroitín sulfato, dermatán sulfato o keratán sulfato [44]. Algunos de estos proteoglicanos como la decorina, biglicano, la fibromodulina y lumican, intervienen en la formación de las fibras colágenas (fibrilogénesis) [43]. En el caso de la decorina, participa en la regulación del tamaño de las fibras de colágeno durante la fibrilogénesis limitando así el diámetro de las mismas [45]. Además, decorina puede participar en la regulación de la proliferación celular y la respuesta inmune [44]. Biglicano, también interviene en el ensamblaje de las fibras colágenas. Este proteoglicano es muy abundante en los tejidos cartilaginosos [46].

Por otra parte, la fibromodulina interviene en el ensamblaje de las fibras colágenas tipo I y tipo II, uniendo los espacios entre ellas [47]. Así mismo, el lumican está muy relacionado a la fibromodulina, y debido a su estructura, es una molécula que contribuye a la retención de agua, otorgándole resiliencia e hidratación a los tejidos [43]. Estos dos SLRPs, también intervienen en la fibrilogénesis del colágeno tipo I y tipo II.

Como representantes de los grandes proteoglicanos, están el agrecano y versicano. Estos proteoglicanos se encuentran en el tejido cartilaginoso contribuyendo a sus propiedades biomecánicas. Además, está altamente concentrado en la etapa embrionaria y es condroinductivo.

El agrecano está unido al ácido hialurónico mediante proteínas de unión, formando grandes agregados de proteoglicanos [48]. Es una molécula altamente glicosilada con numerosas cadenas de condroitín sulfato y keratán sulfato, unidas a una proteína

central [43]. La presencia de numerosas cadenas de keratan sulfato con cargas negativas que se encuentran unidas a la proteína central, conforman la zona donde el colágeno se une al agrecano, esta unión y gran presencia de cargas negativas, contribuye a que la MEC adquiera una alta presión osmótica. Debido a estas cargas negativas, el tejido atrae agua, resultando un tejido altamente hidratado y resistente a las fuerzas de compresión [49]. Cada molécula de agrecano ocupa gran volumen, por lo cual cuando el cartílago es sometido a fuerzas compresivas, el agua se desplaza desde cada molécula de agrecano, y cuando la fuerza es removida, el agua retorna al agrecano [41]. Esta propiedad es de suma importancia para el funcionamiento del tejido cartilaginoso (Fig.15).

El versicano se encuentra en mayor concentración durante la condensación mesenquimal durante el desarrollo del tejido cartilaginoso, y en el tejido adulto puede intervenir en los procesos celulares que contribuyen a la proliferación y migración celular [43].

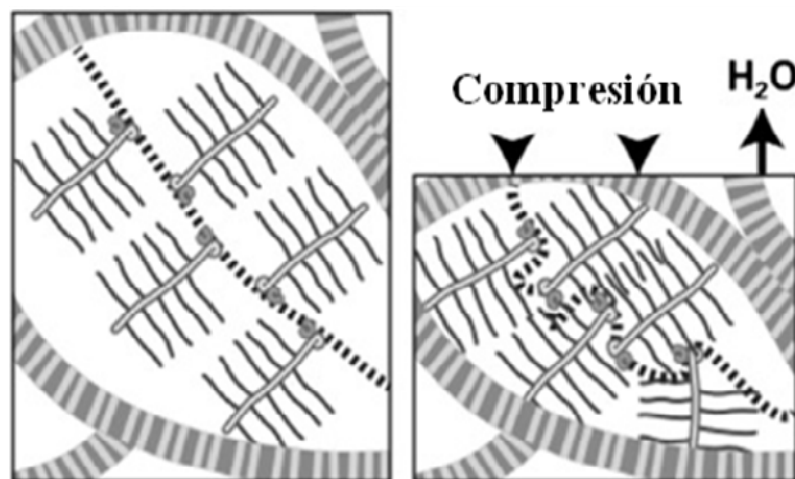


Fig.15 Figura representativa de la función del agrecano en la MEC. Se observa el proteoglicano agregado, con un filamento central de ácido hialurónico unido a cinco moléculas de agrecano, y entrelazadas a las fibras colágenas. Al someterse a compresión, los proteoglicanos se comprimen y se produce la salida de agua (modificado de: Sivan, S et al., 2014) [50].

Las glicoproteínas, son proteínas unidas a carbohidratos. Estas moléculas se encuentran en la MEC y en las uniones celulares [51]. Algunas de las glicoproteínas más importantes del cartílago son de las integrinas, las cuales son proteínas transmembrana y actúan como receptores que median la unión entre la célula y su alrededor [16]. Las integrinas tienen dos funciones, en primer lugar, unir la célula a la MEC y en segundo lugar, actúan como transductor desde la MEC a la célula [16]. Además, se encuentran otras glicoproteínas como la ancorina II situada en la superficie del condrocito que los ancla a las fibras colágenas de la MEC [52]. Así mismo, la fibronectina se encuentra en forma de agregados en los condrocitos y tiene la capacidad de unirse a la fibrina, heparina, colágeno tipo II y hialuronato [53]. Además, en el tejido cartilaginoso, encontramos la laminina, una glicoproteína característica de la membrana basal, la cual en el caso del cartílago se encuentra a nivel de la matriz pericelular [54]. Otra molécula de gran importancia en el proceso de adhesión celular y para el tejido cartilaginoso es la condronectina. La condronectina, es una glicoproteína característica del cartílago, cuya función es fijar la cápsula pericelular de los condrocitos al colágeno II [3].

3. VARIEDADES DE TEJIDO CARTILAGINOSO.

Anteriormente se ha mencionado que el tejido cartilaginoso es un tejido esquelético altamente especializado. Esa especialización viene dada por la composición de la MEC, que varía de un tipo a otro. En ese sentido, el tejido cartilaginoso será clasificado dependiendo de la composición de la MEC, en cartílago hialino, cartílago fibroso o fibrocartílago y cartílago elástico. A continuación se describirán cada uno de las variedades de cartílago.

3.1 Cartílago hialino.

El cartílago hialino es el tipo de cartílago más abundante en el organismo. Es flexible, semitransparente y de color gris azulado. Su distribución en el organismo es amplia y cumple un rol fundamental durante el desarrollo del esqueleto fetal. En el esqueleto adulto, esta variedad de cartílago continúa siendo un elemento importante, localizándose en los cartílagos nasales (septum nasal), cartílagos costales (extremo esternal de las costillas), la laringe, anillos traqueales, bronquios, superficies articulares de las diartrosis [2, 3].

El cartílago hialino, dependiendo si está o no rodeado de pericondrio, y de la etapa de desarrollo en la que se encuentre, puede crecer de manera aposicional o intersticial, incrementando así el volumen y tamaño en todas las dimensiones la proliferación de condrocitos y elaboración de MEC nueva [20].

La MEC del cartílago hialino tiene como principal fibra estructural las fibras colágenas de pequeño diámetro que corresponden a colágeno tipo II, dispuestas en red entremezcladas. Estas fibras al tener el mismo índice de refracción de la sustancia fundamental no se pueden observar con microscopio óptico, por lo cual es necesario realizar técnicas histoquímicas o inmunohistoquímicas específicas para poder visualizarlas [3].

En el cartílago hialino al igual que en los otros tipos de tejido cartilaginoso, se distinguen tres regiones de acuerdo a la disposición de la MEC y su composición: la zona pericelular, la zona territorial y la zona interterritorial (Fig.16).

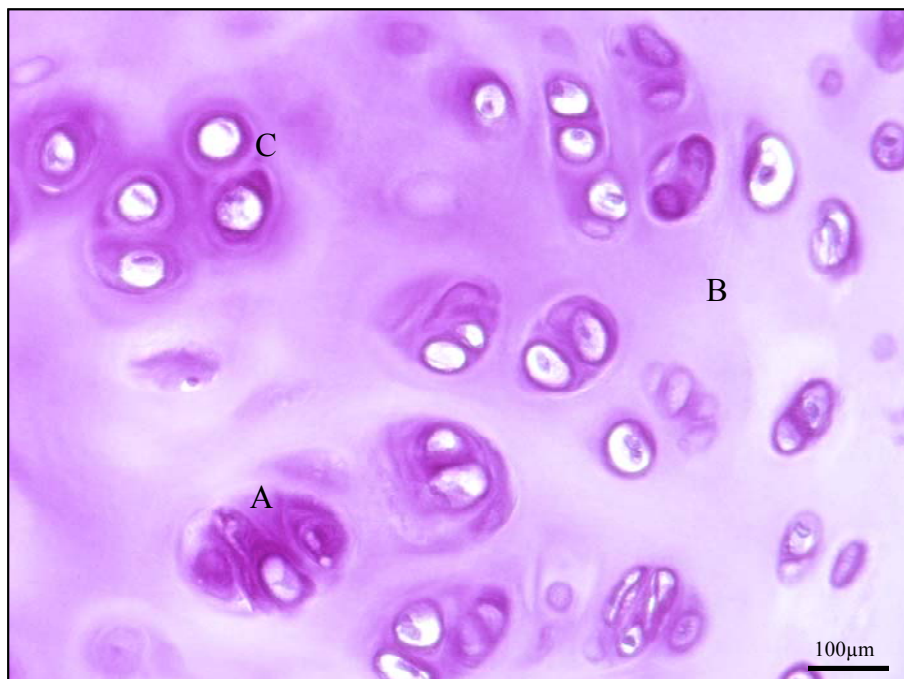


Fig.16 Imagen de corte histológico de cartílago hialino. Tinción Hematoxilina-Eosina. A) Grupo isogénico B) Matriz interterritorial C) Matriz territorial y pericelular. Imagen del Departamento de Histología. Universidad de Granada.

Como se ha mencionado anteriormente, hay un tipo de cartílago hialino más especializado que recubre las superficies de las articulaciones diartroidales. Este cartílago hialino articular posee características muy específicas que no se encuentran en ninguna otra variedad. Su función principal es brindar una superficie suave y lubricada

que facilite la distribución de cargas con baja fricción [5]. Este tipo de cartílago está desprovisto de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, y esta además sujeto a grandes cargas. El punto crítico de este tejido es su limitada capacidad de regeneración, siendo esto una causa de morbilidad musculoesquelética [5].

Histológicamente al no poseer pericondrio, solo posee un tipo de células, los condrocitos, la cantidad de estos varía de acuerdo a la zona del cartílago en un número desde 7.000 a 24.000 cells/mm [55] y se encuentran sumergidos en una matriz compuesta por un 70% de agua [56], un 30% de contenido sólido del cual entre el 50-90% corresponden a proteínas de colágeno y proteoglicanos [27] y el resto a proteínas no colágenas [57]. Estos componentes anteriormente mencionados, contribuyen al mantenimiento y al flujo de agua en la MEC, lo que es fundamental para conservar sus propiedades biomecánicas y químicas.

El cartílago articular adulto tiene un espesor entre 2 y 4 mm y en las zonas de carga 2.4 mm [19]. Sin embargo, este además presenta variaciones en cuanto a espesor, densidad celular, composición de la MEC y propiedades mecánicas de acuerdo a la zona [58]. El cartílago articular está dividido en cuatro zonas bien diferenciadas, en las cuales la orientación y el tamaño celular, la actividad metabólica y la respuesta a cargas mecánicas son diferentes [28] (Fig.17).

El cartílago hialino articular es viscoso y elástico ante la deformación, con superficie lubricada y de baja fricción, puede soportar altas cargas cíclicas sin presentar daños o signos de degeneración [59, 60]. El flujo del agua en el cartílago es el responsable de soportar las grandes cargas [61]. Además, los proteoglicanos contribuyen en las propiedades biomecánicas de este tejido, como es el caso del agregano. Agregano es el proteoglicano más abundante, y le otorga al cartílago hialino articular propiedades

osmóticas para soportar cargas compresivas [5]. La respuesta mecánica del cartílago depende del flujo de fluidos a través del tejido y a través de la superficie articular [61].

A continuación serán descritas brevemente las cuatro zonas que conforman el cartílago hialino articular.

Zona superficial, representa del 10-20% del espesor de cartílago [5] limita con la cavidad sinovial, su mayor composición es de lubricina y proteínas de superficie [62]. Las células ubicadas en esta zona sintetizan colágeno I. Posee pocos proteoglicanos ya que se sintetizan poco y se degradan con facilidad. Las fibras colágenas se encuentran orientadas paralelamente a la superficie articular, y posee un gran número de condrocitos aplanados y de menor tamaño. La integridad de esta capa determina la protección de las zonas más profundas [5]. Esta zona al estar en contacto con el fluido sinovial es responsable de las propiedades mecánicas del cartílago, como su resistencia las fuerzas verticales de tensión y compresión [5].

Zona transicional, representa del 40% al 60 % de espesor de la zona [5]. Las células son más redondeadas, se observa la presencia de colágeno tipo VI y el proteoglicano más abundante es la decorina [19]. En esta zona las fibras colágenas se encuentran distribuidas oblicuamente y los condrocitos son esféricos y están en menor cantidad. Es la primera línea para la resistencia a fuerzas compresivas [5].

En la zona superficial y transicional las fibras colágenas se encuentran orientadas horizontalmente hacia la zona radial.

Zona radial o profunda, esta zona es la responsable de la resistencia a la compresión y representa aproximadamente el 30% del volumen articular. Las fibras colágenas tipo II están distribuidas de manera perpendicular a la superficie articular y posee fibras colágenas de gran diámetro en disposición radial [5, 63]. En esta zona los condrocitos

están más esparcidos y ubicados en forma de columna paralelos a las fibras colágenas, y las proteínas más abundantes son el colágeno tipo II y el agregano [5, 19] Además, posee un alto contenido de proteoglicanos y baja concentración de agua [5].

Zona Calcificada, se encuentra cercana a la zona subcondral donde el cartílago comienza a mineralizarse observándose además, la presencia de colágeno X [19].

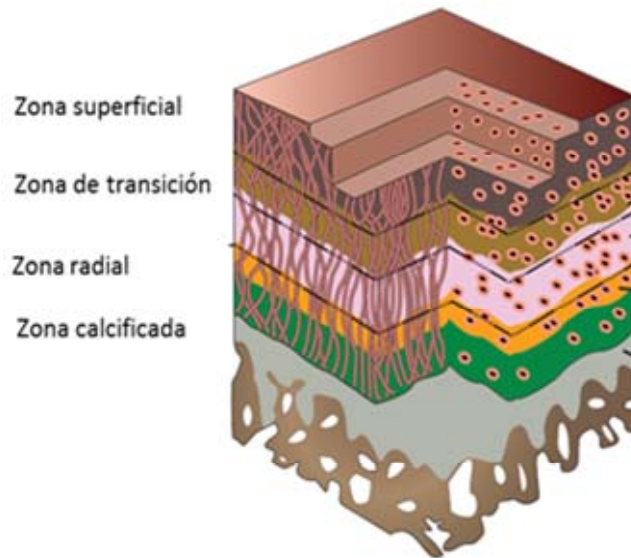


Fig.17 Imagen esquemática de las zonas estructurales del cartílago articular. (modificado de Poole, AR, Kojima, T. et al., 2001) [28].

Para comprender el comportamiento biomecánico del cartílago hay que observarlo como un tejido bifásico, compuesto de una fase fluida acuosa y una fase sólida compuesta por MEC, la cual es permeable y presenta porosidades [64]. Cuando el cartílago es sometido a una carga rápida se produce un incremento de la presión del fluido intersticial, causando que el fluido salga de la MEC, lo que da origen a una gran resistencia a la fricción por parte del tejido [65]. Cuando la carga es retirada, el fluido regresa a la MEC. La baja permeabilidad del cartílago articular evita que el fluido que ha salido de la matriz quede fuera de esta.

3.2 Cartílago fibroso o fibrocartílago

Esta variedad de tejido cartilaginoso, es considerado una transición entre cartílago hialino y tejido conectivo denso [2] (Fig.18). Esta variedad se observa fusionada con el cartílago hialino que la rodea, o con el tejido conectivo fibroso denso. Las células que lo componen se agrupan en cápsulas de MEC ubicadas entre haces de fibras de colágeno [2]. El tipo de colágeno más abundante en el tipo I [3]. Este cartílago se encuentra localizado en zonas donde soportará fuerzas tensionales considerables [2], como en el caso de algunas articulaciones como en el cartílago de la fosa glenoidea del hombro, el acetábulo de la cadera, disco de la articulación temporomandibular, de la articulación acromioclavicular y la articulación esternoclavicular, además se localiza en la sínfisis del pubis [2], también se encuentra en los discos intervertebrales, en sitios de inserción de ligamentos cercano a cartílago hialino, en bordes articulares, discos articulares y meniscos [3, 66]. El fibrocartílago carece de pericondrio por lo que su crecimiento es de tipo intersticial.

En cuanto al fibrocartílago del menisco de la rodilla, tiene características únicas por la compleja geometría, ultraestructura y composición del tejido representada por una hidratada MEC con gran cantidad de colágeno II en la zona más cartilaginosa, y abundante colágeno tipo I en la zona fibrosa y vascularizada [67], así mismo, y al igual que los otros tipos de cartílago, presenta cantidades variables de proteoglicanos, GAGs y glicoproteínas.

Por otra parte, el disco articular presente en las vértebras, está compuesto por un anillo fibroso y fibras colágenas tipo I, también las placas cartilaginosas limitantes están compuestas por cartílago hialino Sin embargo presente en la articulación temporomandibular (ATM) y el disco articular se clasifica histológicamente como fibrocartílago, ya que además de presentar características diferentes al cartílago hialino articular,

también es diferente al fibrocartilago o menisco de la rodilla [68]. En este sentido, las superficies articulares de la ATM están cubiertas por un tejido fibroso que varía en espesor de 0.5 a 2mm y es capaz de soportar y amortiguar las fuerzas de la masticación. Al igual que la distribución de las fibras colágenas en el cartílago articular hialino, en la ATM las fibras colágenas tipo II, se distribuyen paralelas en la zona superficial, y perpendiculares en la zona profunda.

Histológicamente, este tejido fibroso de las superficies articulares de la ATM, posee en su parte interna una zona proliferativa, seguida de una zona de fibrocartilago y una delgada capa de cartílago calcificado [69]. Cabe destacar, que el disco articular que acompaña a la articulación, también está formado por fibrocartilago, compuesto por fibrocondrocitos [70, 71], siendo un 70% fibroblastos y 30% condrocitos [72]. Por otra parte, las fibras colágenas predominantes del disco articular de la ATM son del tipo colágeno I [68] con abundante presencia de fibras elásticas [72]. Además, presenta aproximadamente entre 1-10% de GAGs siendo menos que en el cartílago hialino. Los proteoglicanos como el agrecano, biglicano y la decorina se encuentran también presentes en este tejido [73].

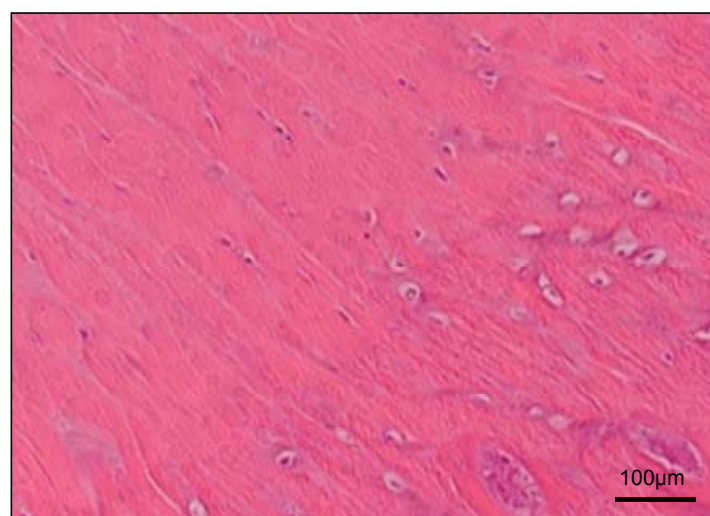


Fig.18 Imagen de corte histológico de fibrocartilago. Magnificación 10X (modificado de Haus BM et al., 2012) [74].

3.3 Cartílago elástico

El cartílago elástico es similar al cartílago hialino. Es un tejido conectivo especializado rodeado de pericondrio, caracterizado por la presencia de condrocitos inmersos en una MEC rica en fibras elásticas y proteoglicanos [20]. La organización tridimensional de las moléculas de la MEC, le confiere a este tipo de cartílago las características de elasticidad, flexibilidad y resistencia a las fuerzas de tensión y compresión [61, 75]. El cartílago elástico se encuentra en el pabellón auricular, el conducto auditivo externo, en la trompa de Eustaquio y la laringe (epiglotis, cartílago de Santorini y cartílago de Wrisberg) [20].

Este tejido se origina a partir del tejido mesenquimal, y presenta un crecimiento de tipo intersticial y aposicional. Macroscópicamente, esta variedad de tejido cartilaginoso posee un aspecto amarillento. Su MEC es rica en fibras elásticas que son muy densas alrededor de la cápsula y pueden ser observadas en tinciones de hematoxilina-eosina (Fig.19A) y especialmente con técnicas histoquímicas como el Verhoeff (Fig.19B) y la orceína (19C-D). Así mismo, el cartílago elástico también posee en su MEC abundantes fibras de colágeno tipo II, y se ha descrito la presencia de fibras colágenas del tipo I [41, 76, 77].

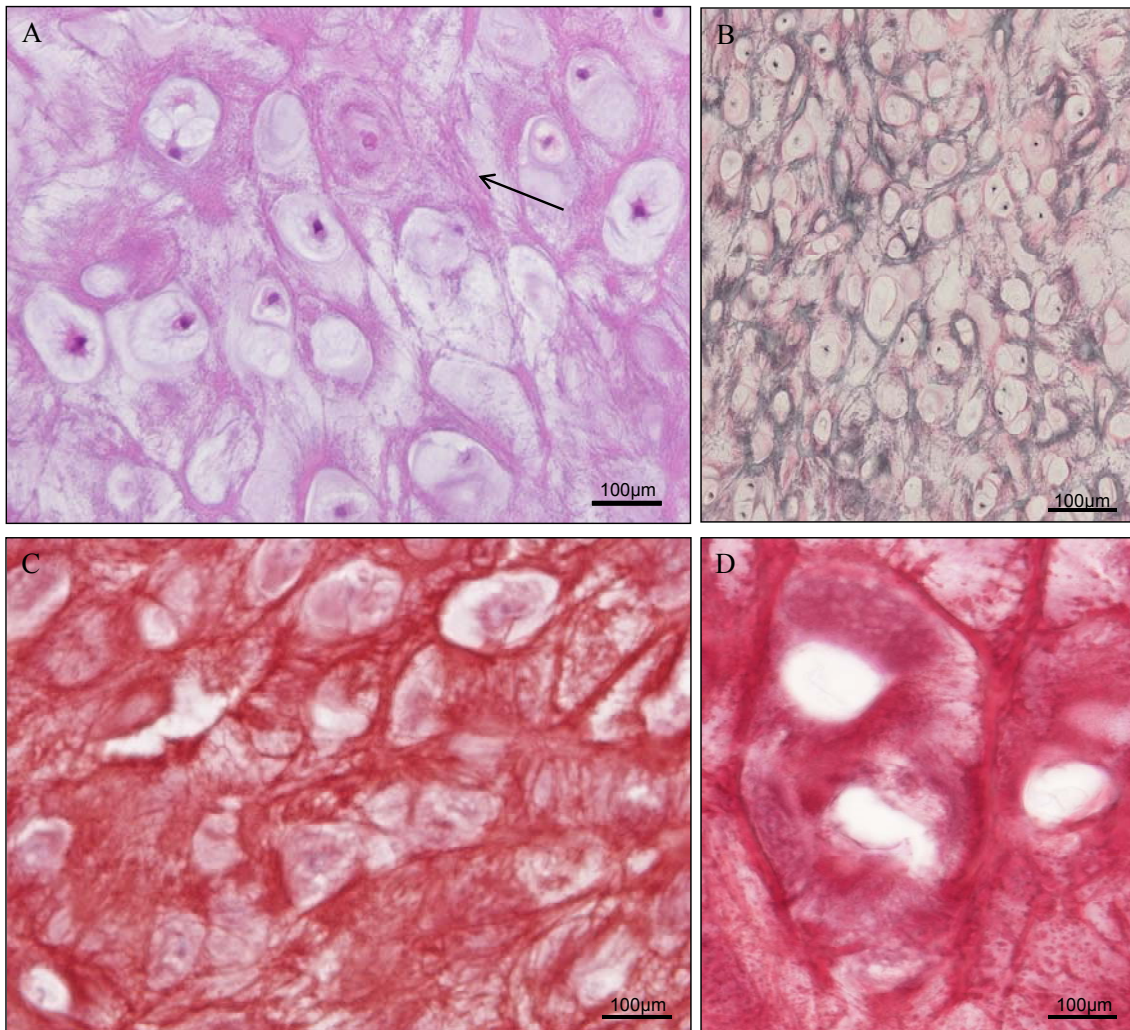


Fig.19 Imagen de corte histológico de cartilago elástico en la cual se observan A) Células, MEC y abundantes fibras elásticas (flecha negra). Tinción H-E. B) Tinción de Verhoeff de cartilago elástico. C-D) Técnica histoquímica de orceína Magnificación 40X y D) Mayor aumento 60X. Imagen del Departamento de Histología. Universidad de Granada.

Recientes estudios desarrollados por Mansfield y colaboradores han descrito algunas similitudes y diferencias histológicas entre el componente celular y de MEC del cartilago hialino y el cartilago elástico [78]. A nivel celular, destaca que el cartilago hialino presenta menor cantidad de células y mayor cantidad de MEC. Por otra parte, la presencia de las fibras elásticas en el cartilago hialino articular están presentes en mayor proporción en la zona territorial que en la interterritorial [78, 79].

El cartilago elástico no posee la capacidad de autoreparación, y debido a esta condición, la gran cantidad de patologías que lo afectan, y baja eficacia de los tratamientos actuales, es que surge la necesidad de obtener nuevas alternativas terapéuticas para estos pacientes. En este sentido, la Ingeniería Tisular brinda una posible alternativa terapéutica para la reparación de las lesiones que afectan a este tejido. La Ingeniería Tisular, combina diversos biomateriales, células y factores de crecimiento, así como otros agentes de estimulación, con la finalidad de crear en *in vitro* distintos tipos de tejidos, para poder reparar, sustituir e incluso incrementar la función de tejidos y órganos dañados [80].

4. PATOLOGÍAS DEL TEJIDO CARTILAGINOSO Y SUS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS.

En general, el cartílago puede verse afectado por anomalías congénitas y síndromes, traumatismos, procesos degenerativos osteoarticulares, enfermedades autoinmunes, infecciones (infrecuentemente), daños del cartílago nasal por efectos tóxicos producidos por drogas, patologías neoplásicas benignas o malignas [81].

Los abordajes de las lesiones de cartílago son generalmente quirúrgicas, como el caso de las lesiones de tráquea donde se ve afectado el cartílago hialino, en este sentido, se han planteado técnicas quirúrgicas como injertos de cartílago costal, parches del pericardio, sin embargo presentan con gran frecuencia complicaciones intra y postquirúrgicas. En el caso de la afectación del cartílago del septum nasal también cartílago hialino, el tratamiento es igualmente quirúrgico empleando cartílago costal para su reconstrucción [82].

Sin embargo, las lesiones más comunes del cartílago hialino, se presentan en el cartílago hialino articular. Su reparación actualmente continúa siendo un desafío debido a las características propias de este tejido y su baja capacidad de curación y regeneración, su condición avascular y de hipoxia hacen que regenerar el cartílago sea complicado.

Actualmente, existen diversas alternativas terapéuticas que buscan dar solución a estas patologías, y podemos dividirlos en tratamientos no quirúrgicos y quirúrgicos.

Entre los tratamientos no quirúrgicos, se incluyen los tratamientos orales mediante el suministro de esteroides, glucosamina, sulfato de condroitina. Las infiltraciones de este-

roides con el que se pretende disminuir el dolor e inflamación. Así mismo, las infiltraciones interarticulares de ácido hialurónico que solo restaura la viscosidad del líquido sinovial [83].

Por otra parte, también como alternativa terapéutica no quirúrgica, se emplean las infiltraciones de plasma rico en plaquetas (PRP) este posee gran cantidad de factores de crecimiento, que estimulan la reparación del cartílago [84]. Así mismo, se ha empleado como terapia células madre mesenquimales [85, 86].

En conjunto y con las terapias anteriormente mencionadas, además, se emplean distintos tipos de estimulación biomecánica, ortopedia, ejercicios, etc., siendo consideradas en conjunto el *Gold estándar* para tratar las lesiones de cartílago hialino articular. Sin embargo, cuando estas terapias no son satisfactorias, o las lesiones en el cartílago hialino articular son muy grandes, las alternativas terapéuticas existentes son los tratamientos quirúrgicos.

A continuación se mencionaran los distintos tratamientos quirúrgicos, para la reparación del cartílago hialino articular.

Desbridamiento artroscópico: Es un tratamiento paliativo que consiste en la remoción del cartílago dañado y se usa un adhesivo de fibrina. Este tratamiento se realiza en lesiones muy pequeñas menores de 2 cm^2 [87].

Condroplastia y microfractura: Este procedimiento quirúrgico se lleva a cabo en lesiones menores de 4 cm^2 , donde se deshibrida la lesión de cartílago entre 1-3 mm de profundidad, posteriormente luego de observar un retorno venoso, se realizan pequeños agujeros de perpendiculares al hueso subcondral, con una separación entre ellos de 3-4 mm. El objetivo de este procedimiento es atraer células medulares y factores de

crecimiento al lugar de la lesión. Sin embargo el cartílago que se forma no es hialino, sino un fibrocartílago o cartílago fibroso [88-91].

Implantación autóloga de condrocitos (ACI): Esta técnica de terapia celular fue reportada por primera vez en el año 1987, está indicada cuando existen lesiones solitarias sin signos de osteoartritis o daño del hueso subcondral. El tamaño de la lesión puede ser de 3-10 cm². Este procedimiento requiere dos intervenciones quirúrgicas, una para la obtención de condrocitos, que posteriormente serán aislados y cultivados en laboratorio, y la segunda cirugía para colocar los condrocitos en la lesión [88-91].

Esta técnica aunque es la más usada, presenta una mayor morbilidad, riesgos de infecciones, mayor coste, y muchas veces el tejido formado es cartílago de tipo fibroso [88-91]

Implantación autóloga de condrocitos asistido por membrana (MACI): Esta técnica quirúrgica está aprobada en Europa, sin embargo, no se realiza en los Estados Unidos. La MACI está indicada para lesiones mayores de 2 cm², en donde se debe utilizar una membrana biodegradable (Generalmente de colágeno III y IV) que servirá como andamiaje para los condrocitos implantados [88-90, 92, 93].

Cuando existe gran daño en el cartílago que involucra el tejido óseo, o cuando el empleo de las terapias explicadas anteriormente fracasa, el único tratamiento disponible, es la sustitución de la articulación por medio de prótesis articulares.

5. TEJIDO CARTILAGINOSO Y SU LOCALIZACIÓN EN EL ÁREA MAXILOFACIAL. PATOLOGÍAS Y ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS.

Se ha descrito anteriormente las tres variedades de tejido cartilaginoso existentes en el cuerpo humano, así como la localización de los mismos. A continuación, se presentará la localización de los distintos tipos de tejido cartilaginoso, en el área comprendida en la región maxilofacial.

En el área maxilofacial podemos localizar las tres variedades de tejido cartilaginoso. El cartílago hialino, se encuentra localizado septum nasal, el cartílago elástico se localiza en el conducto auditivo externo y pabellón auricular [20], finalmente el fibrocartílago o cartílago fibroso, se encuentra localizado en la ATM.

5.1 Patologías que afectan al cartílago maxilofacial y alternativas terapéuticas.

El tejido cartilaginoso presente en la región maxilofacial, en las cuales intervienen en conjunto la cirugía maxilofacial y plástica, se encuentra localizado en el septum nasal, el pabellón auricular y el disco de la articulación temporomandibular.

Como fue descrito anteriormente, el cartílago del septum nasal y pabellón auricular puede verse afectado por patologías congénitas, traumatismos y neoplasias. En este contexto, en ocasiones el cartílago auricular, el cartílago septal y el cartílago costal se han utilizado para reparar algunos defectos craneofaciales [94]. Entre ellos, el aumento

del dorso nasal, el aumento y reparación del piso de la órbita, y para la reconstrucción de los defectos de la pared anterior de la tráquea [95].

En el caso de fibrocartilago presente en el disco de la ATM, además, de ser afectada por las patologías anteriormente descritas, también cabe destacar la presencia de patologías asociadas a la disfunción temporomandibular y enfermedades degenerativas como la osteoartritis. En este sentido, los tratamientos existentes consisten en infiltraciones de distintos medicamentos para disminuir los síntomas, medicación oral y fisioterapia. Sin embargo, cuando la patología es severa, la única alternativa terapéutica es de tipo quirúrgico, mediante la utilización de prótesis temporomandibulares.

En la presente Tesis Doctoral, cabe destacar, que uno de los tejidos más relevantes y que ha sido objeto de investigación, es el cartílago elástico. En el área maxilofacial, dicho cartílago, está presente en el pabellón auricular y conducto auditivo externo. Por este motivo, haremos gran énfasis en describir las patologías que afectan a esta variedad de tejido cartilaginoso, así como, las alternativas terapéuticas actuales para tratar sus defectos. Además, es importante señalar que el cartílago de pabellón auricular, también es utilizado para resolver defectos craneofaciales tal y como se mencionó en el apartado anterior.

De este modo, el pabellón auricular está compuesto por cartílago elástico rodeado por un pericondrio estrechamente unido al cartílago en su superficie lateral y menos unido en su superficie medial [96] y cubierto por piel. El cartílago elástico de dicha zona auricular proporciona soporte al oído y determina su apariencia externa [94].

El cartílago elástico puede ser afectado por las diversas patologías, en las cuales el tratamiento actual es de tipo quirúrgico mediante cirugía plástica y reconstructiva. Sin embargo, obtener resultados óptimos en este campo, continúa siendo un desafío [97,

98]. En este sentido, la lesión más frecuente que afecta al cartílago elástico del pabellón auricular es la microtia (Fig.20). La microtia es una lesión de origen congénito cuya causa es desconocida y su prevalencia es de 17,4 por cada 10.000 nacimientos [99]. Además, existen más de 18 síndromes diferentes a los cuales está asociada la microtia, sin embargo no existe causa genética confirmada [100].

Al plantearse la resolución de este tipo de patología, se presentan controversias en cuanto a la selección del tratamiento más adecuado, lo que dependerá del grado de deformidad del pabellón auricular. En este sentido, se debe seleccionar entre utilizar cartílago costal o un material sintético, seleccionar la técnica quirúrgica a emplear y el tipo de reconstrucción que será llevada a cabo (oseointegrada, protésica o autóloga) [100]. Actualmente, el *Gold estándar* para tratar la microtia, es la sustitución del tejido ausente por cartílago costal cubierto por piel temporoparietal [101]. Esta técnica, tiene la ventaja que al ser autóloga no existe riesgo de rechazo inmunológico. Sin embargo, no siempre está disponible la cantidad de tejido necesario para la reconstrucción, motivo por el cual, la generación de cartílago mediante técnicas de Ingeniería Tisular, se presenta como una alternativa terapéutica innovadora.

En concreto, actualmente la reconstrucción del pabellón auricular en caso de microtia, consiste en obtener cartílago costal, esculpirlo y posteriormente implantarlo en un bolsillo subcutáneo [102]. Esta técnica quirúrgica de sustitución, aunque estéticamente tiene resultados aceptables, conlleva con una serie de complicaciones como: dolor postoperatorio, riesgo de neumotórax, deformidades en tórax, infección, hematomas, seromas, condritis, necrosis del implante o de la piel que lo recubre [103-105]. Además, esta técnica requiere múltiples cirugías para conseguir un aspecto estético [106, 107] y unas propiedades mecánicas similares a las del cartílago elástico nativo [76].

A parte de la técnica anteriormente descrita, existen otras técnicas para la sustitución pabellón auricular, como lo son la colocación de implantes de materiales sintéticos acelulares. Sin embargo, su utilización tiene alta incidencia de infecciones y extrusión lo que conlleva a su remoción quirúrgica [108].

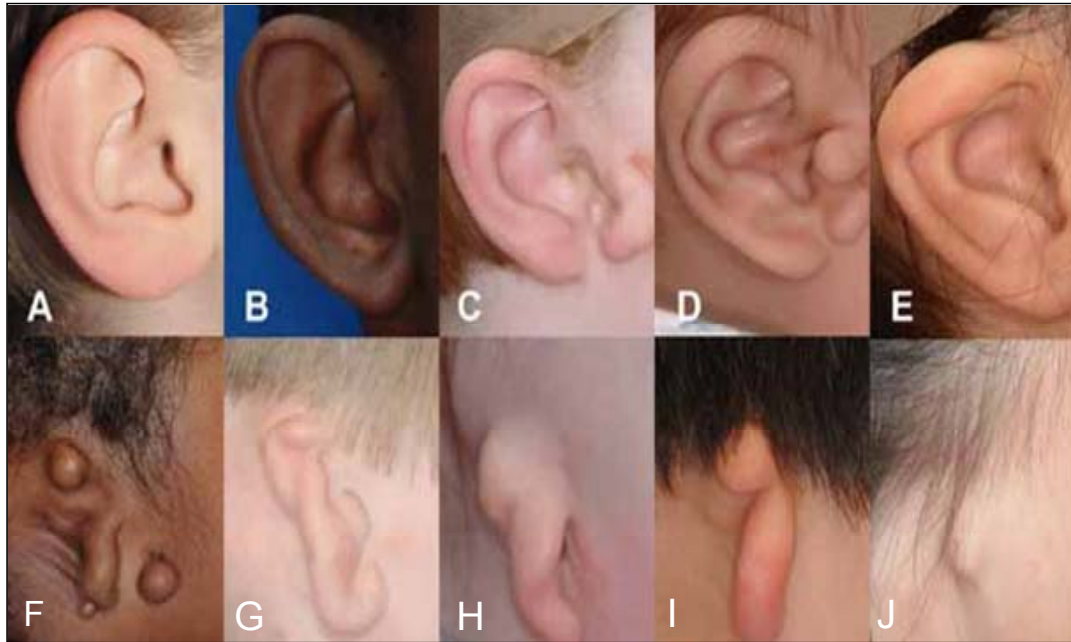


Fig.20 Imagen donde se representan los diferentes grados de microtia A) Pabellón normal B-D) Primer grado de displasia, E) Segundo grado de displasia, F-J) Tercer grado de displasia. Clasificación propuesta por Hunter et al 2009 (modificado de Luquetti, Heike et al., 2012) [99].

Teniendo en cuenta las múltiples complicaciones quirúrgicas derivadas de las técnicas de reconstrucción del cartílago elástico, cabe destacar el surgimiento de nuevas terapias sustitutivas basadas en los principios que rigen a la Ingeniería Tisular. La Ingeniería Tisular, es una disciplina que combina la utilización de matrices, células y factores de crecimiento. Así como, otros agentes físicos de estimulación, con la finalidad de crear en laboratorio distintos tipos de tejidos con características y comportamiento similar a los tejidos que serán sustituidos.

En la presente Tesis Doctoral, se describe un modelo de cartílago elástico generado en el laboratorio mediante técnicas de Ingeniería Tisular.

6. BASES DE LA INGENIERÍA TISULAR.

En la actualidad, la prevalencia de diversas enfermedades congénitas, neoplásicas y traumatismos que afectan gran variedad de tejidos y órganos, tienen como alternativa terapéutica tratamientos quirúrgicos para su resolución, empleando distintos tejidos y biomateriales y de esta manera sustituir el tejido afectado. Sin embargo, la sustitución de tejidos u órganos puede verse afectada por diferentes factores, como la disponibilidad de tejidos para la realización de implantes, el tipo de biomaterial utilizado y las complicaciones que puedan ocurrir, como rechazo inmunológico y las complicaciones inherentes de toda intervención quirúrgica como la infección. Debido a la necesidad existente de sustituir los tejidos dañados o perdidos para brindar una nueva alternativa terapéutica más efectiva y duradera en el tiempo, nace una disciplina médica, denominada Ingeniería Tisular. Esta es una disciplina que combina principios y técnicas de medicina, biología e ingeniería [109] para generar tejidos adultos ausentes o no funcionales.

El objetivo de la ingeniería tisular es promover la regeneración de los tejidos más que en su reparación [110]. El término Ingeniería Tisular fue definido en 1993 por Langer y Vacanti, como la utilización de matrices sólidas y rígidas con células, utilizadas para la fabricación de tejidos [111]. Pero el término se introdujo por primera vez en 1985 en la Universidad de San Diego por el Dr. YC Fung, pero no fue aceptado hasta el año 1987 en la Reunión de la Fundación Nacional de Ciencias [112].

La Ingeniería Tisular ofrece una posibilidad para el tratamiento de este tipo de lesiones, mediante el uso de células, biomateriales, y factores de crecimiento [113-115] que permiten generar tejidos artificiales para sustituir o reparar algún tejido u órgano deteriorado [69]. Actualmente se usan diversos tipos de biomateriales naturales y sintéticos. Estos materiales deben ser en su totalidad biodegradables, biocompatibles, no tóxicos, además, de ser mecánicamente estables [116].

Los biomateriales deben permitir a las células proliferar, migrar, diferenciarse y poderse integrar *in vivo* [116], diversos polímeros naturales y sintéticos han sido empleados para el cultivo de condrocitos [61, 115, 117, 118]. Sin embargo estos biomateriales no son biomiméticos, y pueden desprender metabolitos tóxicos durante su degradación, causando la muerte celular.

7. INGENIERIA TISULAR DEL TEJIDO CARTILAGINOSO.

El tratamiento de las lesiones del cartílago continúa siendo un desafío debido a la poca capacidad de regeneración del tejido cartilaginoso. Aunque se han desarrollado múltiples técnicas quirúrgicas para tratar de solventar esta situación, ninguna ha dado resultados completamente satisfactorios, por lo que han surgido numerosos procedimientos para la generación de cartílago mediante técnicas de Ingeniería Tisular. Cabe destacar, que para el desarrollo del tejido cartilaginoso debe lograrse una combinación apropiada de células, biomateriales y factores de estimulación [119]. La selección correcta de estos tres elementos principales que constituyen la Ingeniería Tisular, es esencial para lograr el correcto ensamblaje de todos los factores involucrados y de esta manera generar nuevos tejidos.

7.1 Células

El objetivo principal para la generación de cartílago, es obtener una fuente celular de fácil aislamiento, con capacidad de expansión en cultivos y que sintetice proteínas específicas de la MEC de cartílago como colágeno II, fibras elásticas y agregano [119]. En este sentido, los condrocitos serían la célula idónea [120], además, los condrocitos ya han sido utilizados para la Ingeniería Tisular de cartílago [121, 122]. Desafortunadamente, entre los inconvenientes que presenta utilizar estas células, está la

tendencia a perder su expresión fenotípica en expansión y la poca disponibilidad que existe en ocasiones de cartílago sano para obtener las biopsias.

Actualmente, existe la tendencia a utilizar células madre mesenquimales, debido a su gran disponibilidad y su capacidad de expansión *in vitro*. Estas células pueden ser aisladas de diversos tejidos y tienen la capacidad de diferenciarse en múltiples líneas celulares [119]. Las células madre mesenquimales (MSCs) de la médula ósea están siendo utilizadas para la condrogénesis en cultivos 3D estimulándolas con diversos factores de crecimiento [119]. Las MSCs derivadas del tejido adiposo constituyen un gran recurso por su disponibilidad y la gran cantidad de células que se pueden obtener, siendo superior a las de la médula ósea [123]. Sin embargo, el potencial condrogénico es menor que las células de la médula ósea [124]. Además de esto, las células madre embrionales también han sido utilizadas para generar matriz de cartílago [125], sin embargo, existe un inconveniente ético fundamental al momento de poder seleccionar y utilizar este tipo de células.

7.2 Biomateriales

El biomaterial ideal para la generación de cartílago debe dar soporte a las células, y tener además las propiedades mecánicas necesarias para permitir que el tejido sea reparado. El material debe ser degradado, así las células y la MEC secretada puedan rellenar el defecto y unirse al tejido existente promoviendo la regeneración [126].

Los biomateriales deben promover no solo la fijación de las células, sino permitir su proliferación y la síntesis de los componentes de la MEC, todo ello sin que se produzca una desdiferenciación de la expresión fenotípica celular.

Los biomateriales para la generación de cartílago se pueden clasificar en cuatro grupos:

1) Basados en proteínas como la fibrina, colágeno, gelatina. 2) Basados en carbohidratos: agarosa, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hialuronato. 3) Sintéticos basados en polímeros 4) Combinados [127].

Para desarrollar un biomaterial adecuado, debe considerarse el cultivo de condrocitos en tercera dimensión, estimulando así la síntesis de moléculas de la MEC. Se han generado biomateriales compuestos por colágeno, ácido hialurónico, fibrina, agarosa, hueso descalcificado, ácidos poliglicólicos, cerámicas, fibras de carbón, quitosano proteínas de seda, gelatinas alginato [115, 128-135] para ser utilizados en Ingeniería Tisular del cartílago y de esta manera inducir la reparación del mismo.

Como se ha descrito, existe una gran variedad de biomateriales que son utilizados para la generación de cartílago, sin embargo, hasta la fecha los biomateriales más adecuados son los basados en membranas, los biomateriales de tipo geles/hidrogeles naturales y las últimas técnicas utilizadas que es la fabricación de matrices 3D [136].

Al día de hoy uno de los biomateriales más estudiados para la Ingeniería Tisular del cartílago son los hidrogeles naturales. Estos han demostrado ser el material más adecuado para desarrollar cartílago, ya que entre sus características están que son hidrofílicos e insolubles en medios acuosos, lo cual es una ventaja para los tejidos creados mediante ingeniería tisular [137]. Este alto contenido en agua lo hace similar al tejido nativo lo cual facilita la proliferación y función celular.

Estos biomateriales naturales, han sido aceptados como biomateriales degradables, no tóxicos, biocompatibles y mecánicamente estables [116], lo que permiten a las células proliferar, migrar e integrarse [116]. Sin embargo, al compararlos con los biomateriales sintéticos se pueden observar algunas desventajas dado a que estos últimos son

hidrofóbicos y requieren largos periodos de tiempo para su degradación, pudiendo desprenderse metabolitos tóxicos [116, 138] que causan daño y muerte celular.

En cuanto a la bioimpresión 3D, se puede decir que ha sido definida como una tecnología innovadora que permite la generación de constructos organizados en tercera dimensión por medio de la colocación de capa sobre capa, combinando células y biomateriales de manera predeterminada [139].

A pesar del desarrollo de todos estos biomateriales para la generación de cartílago, aún no existe el material ideal que reúna todas las características deseadas. Basados en las características que debe tener un biomaterial ideal para la generación de cartílago mediante Ingeniería Tisular, ha surgido un biomaterial, un hidrogel natural resultado de la combinación de fibrina y agarosa. Este hidrogel de fibrina-agarosa, ha sido utilizado con éxito para generar diversos modelos de tejidos en 3D [113, 140-143]. Además, este hidrogel de fibrina-agarosa ha sido mejorado mediante técnicas de nanoestructuración, incrementando sus propiedades mecánicas, [141, 144] lo que lo convierte un material con propiedades biológicas y biomecánicas adecuadas para la Ingeniería Tisular del cartílago [145].

En la presente Tesis Doctoral, se han realizado estudios *in vitro* para determinar la eficacia del biomaterial natural compuesto por fibrina y agarosa, para la encapsulación de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico y posterior generación de un sustituto artificial de cartílago elástico.

7.3 Factores de estimulación.

Entre los factores de estimulación utilizados en la Ingeniería Tisular del cartílago los más utilizados son los factores de crecimiento. Estos factores estimulan al desarrollo de los condrocitos y al mantenimiento de su fenotipo [146].

Entre los factores de crecimiento más utilizados para la generación de cartílago, están el TGF- β (Factor de crecimiento transformante). Este factor es considerado como un potente estimulador de síntesis de proteoglicanos, colágeno tipo II por los condrocitos, además, se ha demostrado que induce a la diferenciación condrogénica de las MSCs *in vitro* [147, 148].

Además, las BMPs en sus variedades BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMP-13, BMP-14 han sido estudiadas y pueden estimular la diferenciación condrogénica de las MSCs, además de, estimular la producción *in vitro* de colágeno tipo II y agregano por los condrocitos [149].

Así mismo, los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs) FGF-2 y FGF-18 han sido ampliamente estudiados. En concreto el FGF-2 que es un factor de crecimiento abundante en el tejido nativo y localizado en la zona pericelular de la matriz de cartílago [150]. Su utilización ha sido enfocada principalmente hacia el mantenimiento del fenotipo condrogénico, para aumentar la proliferación celular y la síntesis de la MEC, además de acelerar la reparación de cartílago [151]. Por otra parte, el FGF-9 y FGF-18 promueven la diferenciación condrogénica y la producción de matriz cartilaginosa [152].

Otro factor ampliamente estudiado es el factor de crecimiento insulínico (IGFs). El cual es considerado como un mediador esencial en la homeostasis y metabolismo del cartílago. Este factor IGF-1 promueve la supervivencia y proliferación de los condro-

citos, además, induce a la diferenciación condrogénica y estimula la síntesis de proteoglicanos [153, 154].

Por otra parte, existen otros factores de estimulación para la generación de cartílago, como son los estímulos mecánicos, los cuales se ha demostrado que son necesarios para el mantenimiento del cartílago. En estudios *in vitro* se ha comprobado que al incorporar estímulos físicos incrementan la diferenciación de las MSCs, y la actividad metabólica de los condrocitos [155]. Otro factor a tener en cuenta es la naturaleza hipóxica de los condrocitos, por lo tanto se puede mejorar la condrogénesis *in vitro* reduciendo las concentraciones de oxígeno[119].

A parte de esto, los cultivos dinámicos mediante el uso de bioreactores, han sido utilizados para acelerar el crecimiento y desarrollo *in vitro* del cartílago [138]. Así mismo, se han empleado para imitar las condiciones de cargas mecánicas que experimenta el cartílago *in vivo* [119].

OBJETIVOS

La generación de cartílago mediante Ingeniería Tisular continúa siendo un desafío, ya que en la actualidad aún no se ha desarrollado un biomaterial ideal que cumpla con todas las características deseadas. En este sentido, en la presente Tesis Doctoral se ha evaluado un biomaterial natural nanoestructurado, un hidrogel natural compuesto de fibrina y agarosa para la encapsulación de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico y la generación de un sustituto artificial por Ingeniería Tisular. Para lo cual que se han planteado los siguientes objetivos:

2.1 Objetivo general

Generar mediante técnicas de Ingeniería Tisular, un modelo de cartílago elástico artificial humano basado en la utilización de biomateriales natural de fibrina-agarosa nanoestructurados y la encapsulación de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico.

2.2 Objetivos específicos

1. Establecer cultivos primarios y expandir los condrocitos humanos derivados de cartílago elástico, y determinar la viabilidad y funcionalidad de estas células mediante técnicas microscópicas para su utilización en la generación de constructos.
2. Generar constructos nanoestructurados a partir de la encapsulación de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico en hidrogeles de fibrina-agarosa.
3. Evaluar la interacción célula-biomaterial, la estirpe celular y la síntesis secuencial de moléculas de la matriz extracelular del cartílago elástico mediante técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas, en los constructos nanoestructurados de fibrina-agarosa con condrocitos encapsulados en su interior.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento y cultivo celular de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico.

Para la realización de la presente Tesis Doctoral, se utilizaron condrocitos humanos derivados de cartílago elástico (CHDCE), obtenidos a partir de pequeñas biopsias provenientes de donantes jóvenes sanos. Estos pacientes fueron sometidos a cirugía menor del pabellón auricular y realizaron la donación de las muestras bajo consentimiento informado.

Las biopsias obtenidas, se conservaron en un medio de transporte a 4°C, donde se mantuvieron hasta ser procesadas en el laboratorio, en un plazo menor de veinticuatro horas. Este medio de transporte se compone de un medio de cultivo suplementado con 6X de antibióticos, siendo utilizados 500 mL de medio básico DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco, Sigma-Aldrich) suplementado con 30 mL de solución comercial de antibióticos y antimicóticos (500U/ml de anfotericina B, Sigma-Aldrich).

Una vez en el laboratorio, las biopsias se dividieron en dos partes, una para aislamiento y cultivo celular y otra para ser usada como control en los análisis histológicos. Los condrocitos se aislaron siguiendo un protocolo previamente descrito [156]. En primer lugar, las muestras fueron fragmentadas en pequeñas secciones e incubadas durante toda la noche en una dilución de 2mg/mL (W/V) colagenasa II, *Clostridium histolyticum* tipo II (Gibco BRL life science technologies) a 37°C, con ciclos de agitación de cinco minutos cada uno.

Posteriormente, las muestras digeridas se centrifugaron a 1000 rpm, durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y el pellet celular obtenido fue resuspendido en medio de expansión y cultivado en frascos de cultivo de 25cm² de superficie tipo Falcon®. Los cultivos se expandieron en un medio de expansión compuesto por una mezcla a

proporción 3:1 de DMEM y Ham's F12, suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de solución antibiótico y antimicótico (100 U7mL penicilina G, 100mg/mL estreptomicina y 0.25 mg/mL anfotericina B), 24 µg/mL de adenina, 0,4 µg/mL de hidrocortisona, 5 µg/mL de insulina, 1,3 ng/mL de triyodotironina (Todos los insumos fueron de Sigma-Aldrich).

Cuando los condrocitos alcanzaron la subconfluencia en los frascos de cultivo, estos se lavaron con 5mL de PBS (tampón fosfato, Sigma-Aldrich) para eliminar el alto contenido proteico del medio de cultivo y las células muertas. Posteriormente, se agregó por cada frasco 3mL de tripsina (Sigma-Aldrich) y se incubo a 37°C por un período de 5 minutos, para obtener células individuales. Una vez comprobado que las células se separaron, se agregó 6mL de suero bovino fetal SBF (Sigma-Aldrich) para neutralizar la acción de la tripsina por saturación la actividad enzimática. Esta solución se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. Una vez centrifugado, se retiró el DMEM. El pellet obtenido se resuspendió en medio de expansión y cultivó en nuevos frascos de cultivo. El medio de expansión fue cambiado cada 3 días, y fue expandido hasta el pase diez.

3.2 Determinación de la viabilidad celular de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico.

Los condrocitos humanos derivados de cartílago elástico cultivados, fueron sometidos a análisis de viabilidad celular con la finalidad de determinar y seleccionar las células más viables de los diez pases.

La viabilidad celular fue analizada por triplicado, utilizando tres placas con 4 pocillos cada una tipo Chambers (Lab-Tek II, Nunc, Rochester, NY, USA) por cada pase. Se utilizó una concentración de 5×10^3 células en cada pocillo en cultivo durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas con PBS e incubadas en 200µL de solución *Live/Dead*® durante 30 minutos. Este análisis se realizó mediante el kit *Live/Dead*®. (Viability/Citotoxicity kit Molecular Probes, UK) siguiendo las indicaciones del fabricante y los estudios previos [156, 157]. Posteriormente, luego de agregar los 200 µl de fluorocromos por pocillo e incubarlas durante 30 minutos, las células fueron lavadas de nuevo en PBS y observadas con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-U (Nikon Instruments Inc, NY, USA). Para el análisis cuantitativo se tomaron 10 imágenes por cada pase, las cuales fueron analizadas con Image J software (National Institute of Health, USA) mediante la función “análisis de partículas” (partícula = 0-500 pixels²). La viabilidad celular fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad} = (N^{\circ} \text{ células vivas} / N^{\circ} \text{ de células totales}) \times 100.$$

3.3 Preparación de hidrogeles de fibrina-agarosa y encapsulación de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico.

La preparación de los hidrogeles de fibrina-agarosa se realizó siguiendo los protocolos estandarizados previamente por nuestro grupo de investigación [140, 141, 145].

En resumen, para preparar un volumen final de 60mL de hidrogel de fibrina-agarosa, se mezclaron 45.6 mL de plasma humano y 4.5mL de medio de expansión que contiene los condrocitos humanos derivados de cartílago elástico del pasaje 2. Posteriormente y para evitar la fibrinólisis, se agregaron 900µL de ácido tranexámico (Anchafibrin; Fides-Ecofarma, Valencia, España). Esta solución se mezcló y se agregaron 6mL de cloruro de calcio al 2% y 3mL de agarosa tipo VII (Sigma-Aldrich). La solución resultante se

colocó en pocillos de 5mL y se mantuvo a 37°C hasta completar el proceso de gelificación.

Como resultado se obtuvieron constructos de 3cm de diámetro y 0,5 cm de grosor de fibrina con agarosa al 1% con condrocitos humanos derivados de cartílago elástico (CHDCE).

En esta Tesis Doctoral se definieron 2 grupos experimentales en función de la concentración de células. El grupo A y el grupo B. El grupo A con una concentración de 4.5×10^3 CHDCE/mL y grupo B 45×10^3 CHDCE/mL. Además, ambos grupos fueron analizados por triplicado.

3.4 Nanoestructuración de los constructos de fibrina-agarosa.

La nanoestructuración de los constructos se realizó siguiendo los protocolos establecidos en estudios previos [141, 144]. A continuación, se detalla minuciosamente el proceso de nanoestructuración. En primer lugar, los constructos fueron removidos de los pocillos, y colocados entre dos membranas de nylon ($0.22\mu\text{m}$; Merck-Millipore). Posteriormente, se comprimieron entre dos piezas de papel de filtro Whatman. La presión aplicada fue de 500g durante 2.5 minutos (Fig.21). De esta manera, se obtuvieron constructos nanoestructurados de fibrina-agarosa con CHDCE (Fig.22), los cuales fueron mantenidos en condiciones de cultivo pero sin factores de estimulación condrogénica, solo se utilizó el medio de expansión explicado en el apartado de aislamiento de condrocitos y cultivo celular.

Los análisis histológicos se llevaron a cabo a la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta semana. Las muestras se realizaron por triplicado para su análisis.

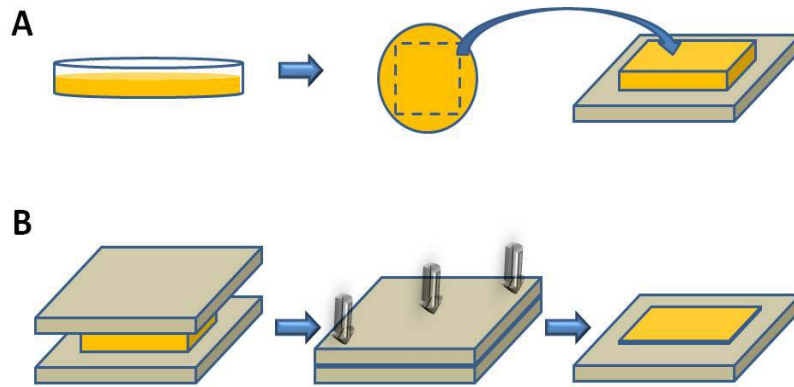


Fig.21 Esquema representativo del proceso de nanoestructuración de constructos. A: Constructo removido del pocillo y colocado sobre una base y dos membranas de nylon. B: Constructo cubierto con piezas de papel de filtro Whatman, aplicando presión de 500g durante 2.5 minutos, mostrando el resultado final (modificado de Carriel V et al., 2015) [141].



Fig.22 Imagen representativa del resultado final de un constructo de hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurado. Imagen del Departamento de Histología. Universidad de Granada.

3.5 Análisis histológico

Una vez obtenidos los constructos nanoestructurados de fibrina-agarosa con CHDCE, se procedió a preparar las muestras para su análisis histológico. Fueron analizados tanto el grupo control como los grupos experimentales.

3.5.1 Procesamiento de muestras

Para el análisis histológico, las muestras en primer lugar fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) y fijadas en formalina neutra al 10% por un período de 24 horas. Posteriormente, fueron deshidratadas en soluciones crecientes de alcohol a concentraciones de 70°, 96° y 100°, y soluciones de xilol. Una vez deshidratadas las muestras, estas se incluyeron en parafina, obteniendo bloques para su posterior corte y análisis (Tabla.1).

	REACTIVO	TIEMPO (TEJIDO)	TIEMPO (BIOMATERIAL)
1	Formalina 10%	30 min.	15 min.
2	Alcohol 70%	30 min.	20 min.
3	Alcohol 96% I	30 min.	20 min.
4	Alcohol 96% II	30 min.	30 min.
5	Alcohol 99% I	30 min.	30 min.
6	Alcohol 99% II	30 min.	20 min.
7	Alcohol 99% III	30 min.	20 min.
8	Xilol I	30 min.	30 min.
9	Xilol II	30 min.	10 min.
10	Xilol III	10 min.	10 min.
11	Parafina I	30 min.	30 min.
12	Parafina II	30 min.	30 min.
13	Inclusión de muestras	6 horas.	4 horas.

Tabla.1 Protocolo de deshidratación, aclaramiento e impregnación en parafina de muestras biológicas para estudio histológico utilizando el equipo Citadel 2000, Thermo Scientific.

Los bloques de parafina, fueron seccionados en micrótomo a un grosor de 5 μ m y colocados sobre portaobjetos silanizados, para favorecer la adhesión de los tejidos.

Previo a la realización de las técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica, las muestras fueron secadas en horno a 55°C durante 60 minutos. Posteriormente, las muestras fueron desparafinadas e hidratadas, para la realización de las técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas (Tabla.2). El protocolo utilizado se detalla a continuación:

SOLUCIÓN	TIEMPO
Xilol	10 min.
Xilol	10 min.
Xilol	10 min.
Alcohol 100°	5 min.
Alcohol 100°	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol 96°	5 min.
Alcohol 70°	5 min.
Alcohol 70°	5 min.
Agua destilada	5 min.

Tabla. 2 Protocolo de rutina de desparafinación e hidratación de muestras.

3.5.2 Técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas.

Tinciones y técnicas histoquímicas.

Para la evaluación histológica de las muestras, se realizó en primer lugar el método de tinción Hematoxilina-Eosina (H-E), para identificar las estructuras presentes en los constructos y la morfología celular. Para realizar esta tinción, una vez desparafinadas e hidratadas las muestras, se procedió a incubarlas en una solución de hematoxilina de Mayer por 5 minutos. Se aclaró la tinción en agua corriente por 5 minutos, y posteriormente se lavaron con agua destilada. Posteriormente, las secciones se contrastaron con Eosina durante 3 minutos para su posterior deshidratación en concentraciones crecientes de alcohol, aclaramiento y montaje.

Con respecto a las técnicas histoquímicas, las fibras elásticas fueron identificadas con el método de orceína, mientras que los proteoglicanos sulfatados fueron teñidos con la técnica de azul alcian. Para la técnica histoquímica de orceína, se realizó el siguiente protocolo: Una vez hidratadas las muestras, estas se colocaron en la solución de orceína durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron en agua corriente por 15 minutos y se contrastaron con hematoxilina de Mayer por 30 segundos. Posteriormente se lavaron y se procedió a la deshidratación, aclaramiento y montaje.

Para realizar la técnica histoquímica de azul alcian se llevó a cabo el siguiente protocolo. Primero las muestras fueron teñidas en solución de azul alcian pH 2.5 durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron con agua destilada y posteriormente se contrastaron con *nuclear fast red* durante 5 minutos, para su posterior aclaramiento, deshidratación y montaje. Estos métodos histoquímicos se realizaron, tanto en el grupo control, como en los grupos experimentales.

Técnicas inmunohistoquímicas

Para la identificación de proteínas específicas del cartílago, se llevaron a cabo técnicas inmunohistoquímicas. Estas técnicas se llevaron siguiendo los protocolos previamente establecidos (Tabla.3).

Tras la hidratación de las muestras de estudio, se procedió a la recuperación antigénica, debido a que muchos épitopes de los antígenos pueden quedar enmascarados durante el proceso de fijación por la formalina. Esta recuperación antigénica puede ser con calor o digestión enzimática. La selección del tipo de recuperación, dependió de la proteína que identificamos. A continuación, se realizaron 3 lavados con agua destilada durante 3 minutos cada uno, y luego 3 lavados más de 3 minutos con PBS. El bloqueo de

peroxidasa endógena, se realizó colocando las muestras en una solución de peróxido de hidrógeno al 37% en metanol a una proporción 1/9, durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados de 3 minutos con PBS y se procedió al bloqueo de sitios antigénicos inespecíficos con caseína durante 15 minutos. Se retiró el exceso de caseína y se procedió a la incubación del anticuerpo primario durante 1 hora, a una dilución específica para cada anticuerpo (Tabla.4). Una vez transcurrido el tiempo de incubación del anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados en PBS de 3 minutos cada uno y se procedió a la incubación del anticuerpo secundario durante 30 minutos a temperatura ambiente, la selección del anticuerpo secundario dependió del tipo de anticuerpo primario que utilizamos. Luego de la incubación del anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados con PBS durante 3 minutos cada uno, y posteriormente se realizó el revelado con DAB (3, 3'-Diaminobencidina). En el caso de la identificación del anticuerpo anti-mitocondria se utilizó para el revelado el DAB con níquel, dando una reacción en color gris.

El tiempo de revelado para cada inmunohistoquímica, dependió de la estandarización previa para cada marcador. Luego del revelado, se procedió a lavar con agua destilada y a realizar el contraste con Hematoxilina por 15 segundos, e inmediatamente haciendo el viraje en agua corriente, de esta manera se lavó el exceso de hematoxilina. Una vez realizado el contraste, se deshidrató de manera rápida las muestras, en concentraciones decrecientes de alcohol y xilol. Al finalizar la deshidratación de las muestras, estas fueron montadas con un cubreobjetos utilizando.

Cabe destacar, que todas las técnicas de inmunohistoquímica se realizaron bajo las mismas condiciones y parámetros, utilizando controles positivos y controles negativos técnicos de cartílago elástico humano y omitiendo el anticuerpo primario en el control negativo.

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUIMICA

PROCEDIMIENTO	TIEMPO	SOLUCIÓN/ DILUCIÓN
Desparafinar e hidratar	10 min. c/u (xilol) x 3 5 min. c/u (ETOH 70°,96°,100° y H ₂ O ₂).	Batería de desparafinación.
Recuperación antigénica	25 min. a 95°C. Enfriar por 20 min.(a temperatura ambiente) o digestión enzimática.	Buffer citrato Ph6.0 o Buffer EDTA Ph8.0 Pepsina o Condroitinasa.
Lavado en agua destilada	5 min. a temperatura ambiente.	Agua bidestilada.
3 lavados en PBS tween 20	5 min. c/u a temperatura ambiente.	PBS 0,1 m, 0,3% tween 20.
Bloqueo peroxidasa	10 min. a temperatura ambiente.	H ₂ O ₂ (3%) en PBS.
3 lavados PBS tween 20	5 min. c/u a temperatura ambiente.	PBS 0,1 m, 0,3% tween 20.
Bloqueo de sitios antigénicos inespecíficos	15 min.	Caseína.
Incubación anticuerpo primario	El tiempo de incubación depende del anticuerpo usado.	La dilución está estandarizada y depende del anticuerpo usado.
3 lavados en PBS tween 20	5 min. c/u a temperatura ambiente.	PBS 0,1 m 0,3% tween 20.
Incubación anticuerpo secundario	Polímero impress reagent (vector) 30 min.	Dependió del anticuerpo primario utilizado.
3 lavados en PBS tween 20	5 min. c/u a temperatura ambiente.	PBS 0,1 m 0,3% tween 20.
Revelación	2-5 min.	DAB.
Lavado en agua destilada	5 min. a temperatura ambiente.	Agua bidestilada.
Contraste	15 segundos.	Hematoxilina de Harris.
Deshidratar, aclarar y montar	10 segundos c/u.	Batería deshidratación.

Tabla.3 Protocolo general utilizado para la realización de las técnicas de inmunohistoquímica.

ANTICUERPOS	DILUCIÓN INCUBACIÓN	RECUPERACIÓN
Rabbit Anti-S100 Policlonal. Dako .No. Cat Z0311	1:400 60 min.	Buffer Citrato Ph6.0 25 min. a 95°C.
Mouse Anti-Vimentin Monoclonal. Clon V9. Sigma-Aldrich. Producto No V6630	1:200 60 min.	Buffer Citrato Ph6.0 25 min. a 95°C.
Mouse Anti-PCNA. Clon PC10. Monoclonal. Sigma-Aldrich .No. Producto P8825	1:1000 60 min.	Buffer Citrato Ph6.0 25 min. a 95°C.
Rabbit Anti-Cortactin EP1922Y .Monoclonal. ABCAM. Ref. ab81208	1:100 60 min.	Buffer EDTA Ph8.0 25 min. a 95°C.
Mouse Anti-Mitocondria Monoclonal. Clon 113-1. Millipore. Ref. MAB1273	1:80 60 min.	Buffer EDTA Ph8.0 25 min. a 95°C.
Rabbit Anti-Coll I. Policlonal. Acris. No. Cat. R1038	1:500 90 min.	Pepsina 10 min. a 37°C.
Rabbit Anti-Coll II. Policlonal. EMD Millipore. Ref. AB2036	1:250 toda la noche a 4C.	Buffer EDTA Ph8.0 25 min. a 95°C.
Mouse Anti Human Aggrecan. Monoclonal. Clon 5D3AbD. Serotec. No.Cat. MCA4722	1:250 60 min.	Condroitinasa (Sigma Cat NC3667)60 min. a 37°C.
Rabbit Anti-Biglycan. Policlonal. ABCAM. Ref. ab49701	1:100 60 min.	Buffer Citrato Ph6.0 25 min. a 95°C.
Rabbit Anti-Versican Policlonal. ABCAM. Ref. ab19345	1:100 toda la noche a 4C.	Condroitinasa (Sigma Cat NC3667)60 min. a 37°C.

Tabla.4 Tabla representativa de los distintos anticuerpos utilizados para los análisis inmunohistoquímicos.

Para la identificación del origen mesenquimal y condrogénico de los condrocitos utilizados en los hidrogeles nanoestructurados de fibrina-agarosa, se identificó la proteína S100 y Vimentina.

La proteína S100 cumple numerosas funciones dentro y fuera de la célula. S100 interviene en la modulación enzimática, homeostasis del calcio, crecimiento y movilidad celular, regulación del ciclo celular y diferenciación celular. Además, interactúa con los receptores de superficie de la célula, y participa en la transducción celular [158].

La proteína S100 fue identificada en cartílago por primera vez por Stefansson en tejido humano y fetal, mediante técnicas de inmunohistoquímica, esta proteína fue encontrada en el núcleo celular y citoplasma [159]. La proteína S100 ha sido estudiada como marcador fenotípico de los condrocitos o para determinar el origen condrogénico de las células [160, 161]. Diversos estudios relacionan la síntesis de S100 con procesos reparadores del cartílago, así como su influencia en la actividad metabólica de los condrocitos y en la síntesis de la MEC [162].

Otro marcador utilizado en la presente Tesis Doctoral fue la Vimentina, con el objetivo de determinar el origen mesenquimal de las células. La Vimentina, es la mayor proteína de filamento intermedio de las células mesenquimales que emerge como un organizador de proteínas envueltas en la adhesión, migración y señalización celular [163].

Para determinar el grado de proliferación celular, se identificó el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) [164]. PCNA es una proteína que se expresa a nivel del núcleo en células en división mitótica, y es un componente esencial de la maquinaria de replicación del ADN. Además, interactúa con proteínas celulares envueltas en el ciclo de regulación celular [165].

Para evaluar la migración celular de los condrocitos encapsulados en los hidrogeles nanoestructurados de fibrina-agarosa, se identificó mediante técnicas inmunohistoquímicas, la cortactina. La cortactina es una proteína de unión a filamentos de actina, y es

diana de múltiples quinasas, además, ha emergido como un elemento central que conecta las vías de señalización con la reestructuración del citoesqueleto [166].

La cortactina, se relaciona con la migración celular, incluso se ha demostrado el papel importante que tiene esta proteína en la movilidad de distintos tipos de células, como los fibroblastos, células endoteliales y distintas líneas celulares de carcinomas [167].

La proteína cortactina se expresa dentro de las células en lugares de ensamblaje dinámico de actina siendo considerada como un marcador para protrusiones de motilidad ricas en actina como la lamelipodia e invadopodia [168-170].

Además, se identificó la presencia de superficie mitocondrial humana intacta utilizando un anticuerpo monoclonal anti-mitocondria [171].

Para identificar el componente fibrilar colágeno de la MEC sintetizada por los condrocitos encapsulados en los hidrogeles de fibrina-agarosa, se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas para determinar la presencia de colágeno I y colágeno II. El colágeno es una molécula de triple hélice que se presenta en forma de fibras colágenas, formando la mayor parte de la MEC y contribuyendo a mantener su estructura.

De igual forma, la identificación de proteínas no fibrilares constitutivas de la MEC se llevó a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas para el caso de agregano, biglicano y versicano. En primer lugar, el agregano, es el proteoglicano agregado de condroitín sulfato más importante [172]. El cual proporciona al cartílago la estructura de gel hidratado otorgándole la capacidad de resistir cargas compresivas. Es un importante mediador de las interacciones entre condrocitos y entre la MEC y los condrocitos. En segundo lugar, cabe recordar que el biglicano pertenece al grupo de pequeños proteoglicanos y es un componente estructural de la MEC que interviene en funciones de señalización [173].

El último proteoglicano estudiado en esta Tesis Doctoral, fue el versicano, este al igual que el agrecano pertenecen a la familia agregados de condroitín sulfato de la MEC e interviene en el desarrollo de tejidos embrionarios. Además, posee un rol importante en la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular [174-177].

3.4 Análisis estadísticos

Para determinar el índice de proliferación celular en cada grupo experimental, se realizó el conteo de las células presentes en cada campo, determinando cuantitativamente el número de células que dieron reacción positiva para PCNA. Se tomaron tres campos de tres diferentes láminas a una magnificación de 400x (área de 6×10^4).

Para realizar el análisis estadístico se determinó la normalidad de los índices de proliferación con el test estadístico Shapiro-Wilk. Los resultados al tener una distribución no normal, se analizaron con el test no paramétrico Mann-Whitney y así comparar los valores de la viabilidad celular de los diez pases. Además, de comparar el índice de proliferación celular entre los grupos.

Todos los datos fueron analizados con SPSS 16.00 software. El valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

Una vez aplicada la metodología descrita en el apartado anterior, en la cual se elaboraron los constructos nanoestructurados de fibrina-agarosa con condrocitos humanos derivados de cartílago elástico encapsulados en su interior, y evaluados los mismos mediante las técnicas mencionadas, procedemos en la presente Tesis Doctoral, a exponer los resultados obtenidos.

4.1 Generación de cultivos de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico.

Los condrocitos provenientes de pequeñas biopsias de cartílago de pabellón auricular, fueron aislados con colagenasa II y expandidos *in vitro* con medio de expansión.

Los condrocitos proliferaron adecuadamente a lo largo de los 10 pases, obteniendo la subconfluencia de los primocultivos a los 15 días, y posteriormente, por cada pase, la subconfluencia celular se alcanzó entre los 5 y 7 días (Fig.23).

La morfología de los condrocitos en cultivo *in vitro* (2D) observada con microscopía óptica, fue poligonal, presentando prolongaciones citoplasmáticas que se originan en la parte delantera de la célula (lamelipodia), lo que permite su migración. También presentaron otro tipo de prolongaciones citoplasmáticas en forma de dedos (filipodia) [178].

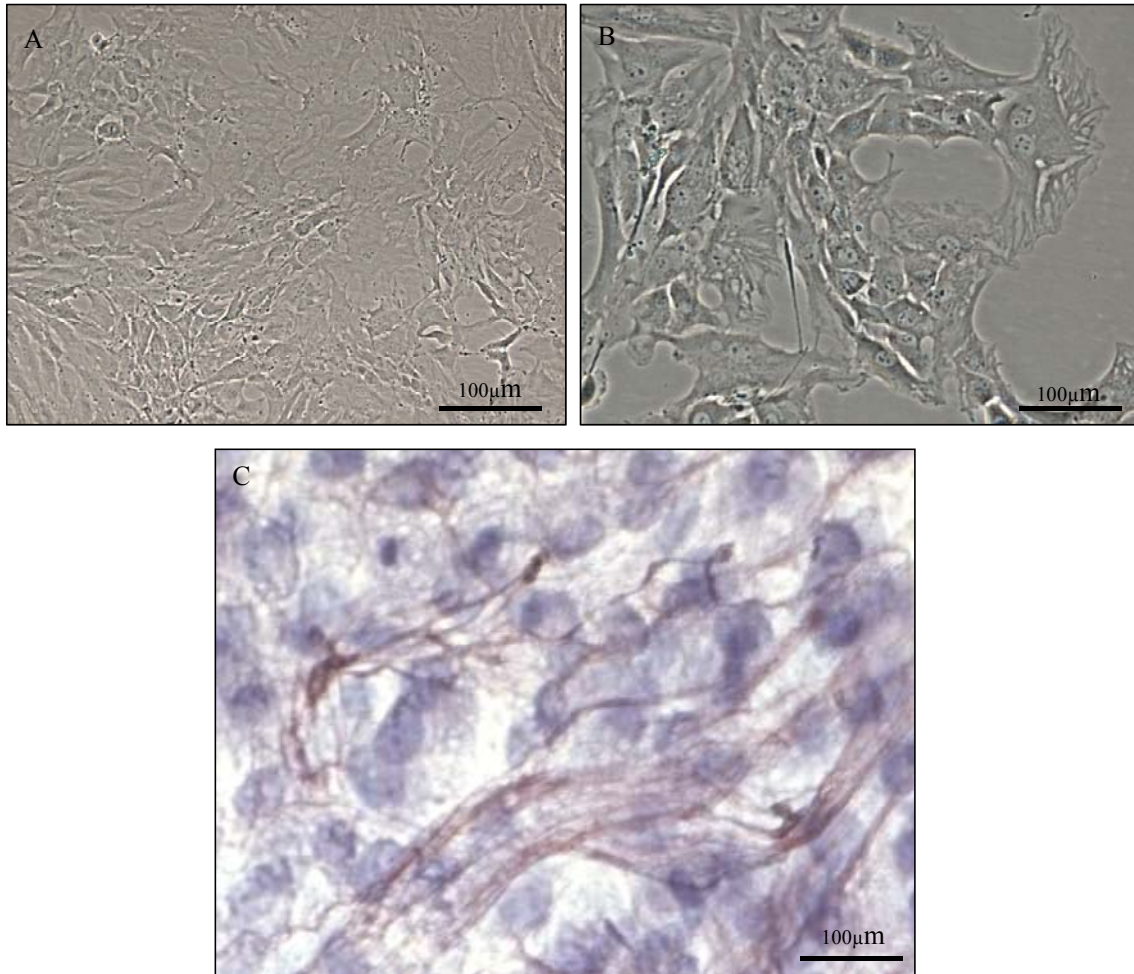


Fig.23 Imagen representativa de la morfología y función de los condrocitos cultivados *in vitro* presentando diferentes tipos de prolongaciones citoplasmáticas observadas con microscopio óptico. A) Magnificación 20X B) Magnificación 40X. C) Imagen donde se observan las fibras elásticas sintetizadas por los condrocitos cultivados *in vitro*. Magnificación 40X.

Los condrocitos a partir del cuarto pase y durante los cultivos *in vitro*, sintetizaron fibras elásticas (Fig.23C). Estas fibras fueron identificadas mediante la técnica histoquímica de tinción con orceína.

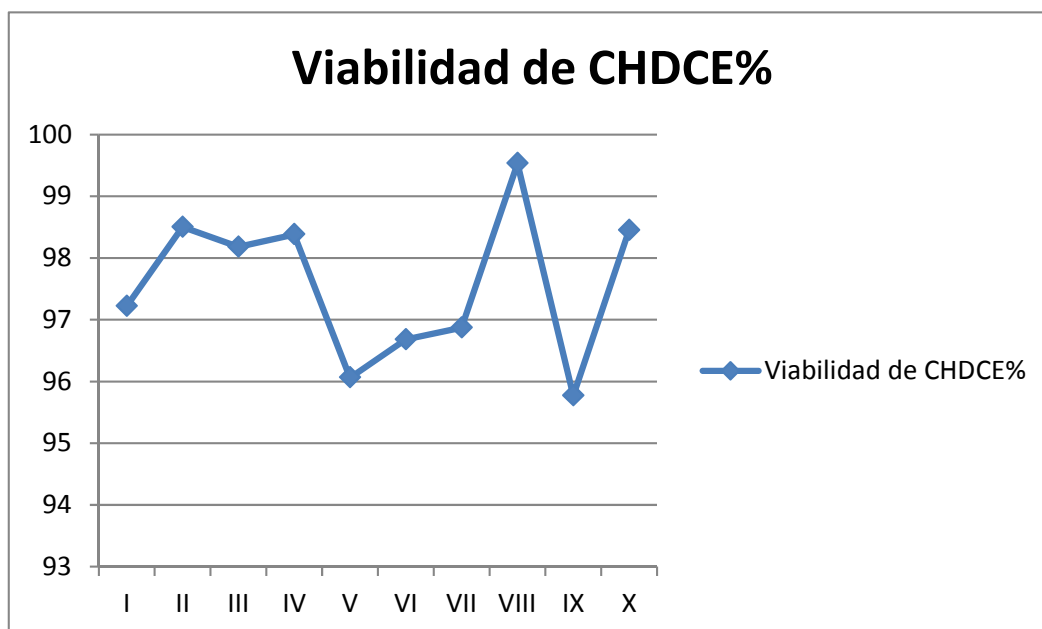
4.2 Evaluación de la viabilidad celular determinada mediante la técnica *Live/Dead*®.

Una vez realizado el análisis de los datos de viabilidad celular obtenidos mediante la técnica *Live/Dead*®, se observó que los cultivos celulares presentaron una alta viabilidad a lo largo de los 10 pases (Tabla.5) (Fig.24).

Los porcentajes de viabilidad celular de todos los pases varió entre 95% y 99% , siendo la media de 97,55% con una desviación estándar de $\pm 1,22\%$, observándose los valores más altos en el pase 2 (98,50%) y el pase 8 (99,53%) (Gráf.1).

Pase	Viabilidad %	Desviación Estandar
I	97,22	± 1,96
II	98,50	± 0,48
III	98,18	± 0,97
IV	98,38	± 1,09
V	96,06	± 2,62
VI	96,68	± 1,72
VII	96,87	± 2,30
VIII	99,53	± 0,41
IX	95,77	± 1,97
X	98,45	± 0,70

Tabla.5 Viabilidad celular de los condrocitos humanos cultivados *in vitro* en cada pase.



Gráf.1 Viabilidad celular de los diez pases estudiados.

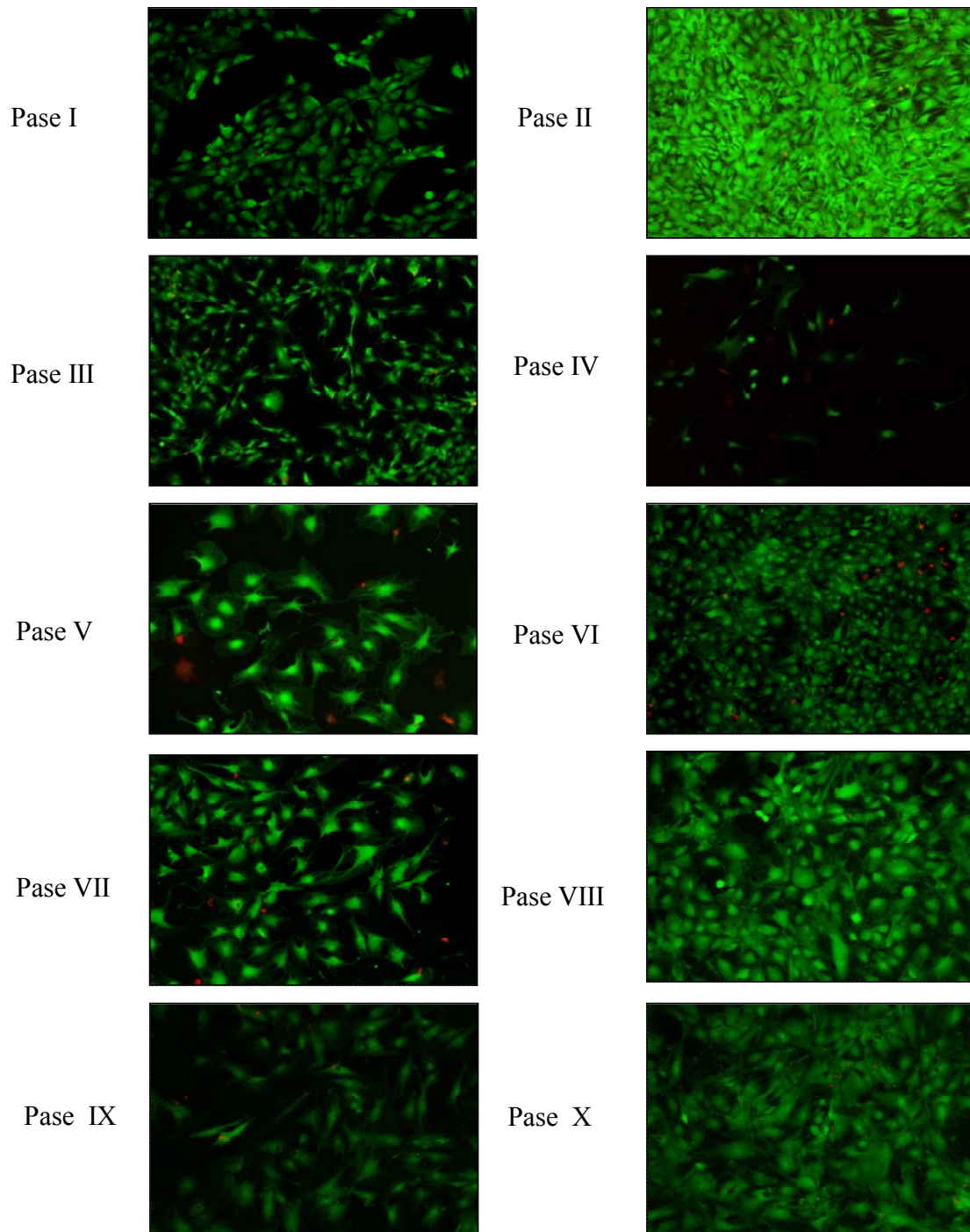


Fig.24 Imagen demostrativa de la viabilidad celular en los diez pases de cultivo celular, mediante la prueba Live/Dead Verde =Células vivas. Rojo:=Células muertas. Imágenes de microscopia de fluorescencia. Magnificación 10X.

Aunque la viabilidad celular más alta corresponde al pase ocho, se utilizaron los condrocitos provenientes del pase dos para ser encapsulados en los hidrogeles de fibrina-agarosa, estas células, también mostraron valores de viabilidad muy alto y al ser de un pase temprano se evita la desdiferenciación *ex vivo* [76, 179-181], que es el principal inconveniente de los cultivos de condrocitos.

4.3 Resultados histológicos de la interacción célula-biomaterial.

La interacción célula-biomaterial de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico encapsulados en hidrogeles nanoestructurados de fibrina-agarosa fue evaluada de la siguiente manera:

El análisis se realizó en los dos grupos de estudio, grupo A (4.500 células/mL) y grupo B (45.000 células/mL). Se demostró mediante la tinción de hematoxilina-eosina, que las células se distribuyeron en el hidrogel de fibrina-agarosa, así mismo, se observó que durante las 5 semanas de estudio *in vitro*, los condrocitos mostraron una mayor proliferación a medida que aumentaba el tiempo de cultivo, siendo más evidente en el grupo B (Fig.25).

En el grupo A hubo una mayor proliferación celular durante las tres primeras semanas de cultivo, posteriormente en la semana 4 y 5 la proliferación fue menos marcada.

Se observaron características muy interesantes en el comportamiento célula-biomaterial. Una de ellas, fue la formación de cúmulos celulares en la extensión del biomaterial (Fig. 25 Flecha negra). Por otra parte, las células fueron capaces a partir de la segunda semana de cultivo de degradar el biomaterial, lo cual es de suma importancia que ocurra con los biomateriales utilizados en ingeniería tisular. Esta degradación del biomaterial, se

observó en ambos grupos de estudio, pero fue más marcada en las zonas donde se produjeron los cúmulos celulares en el grupo B (Fig.25 círculo negro).

Cabe destacar, que los condrocitos encapsulados en la matriz de fibrina-agarosa, poseen una morfología irregular, que varía entre células elongadas y esféricas.

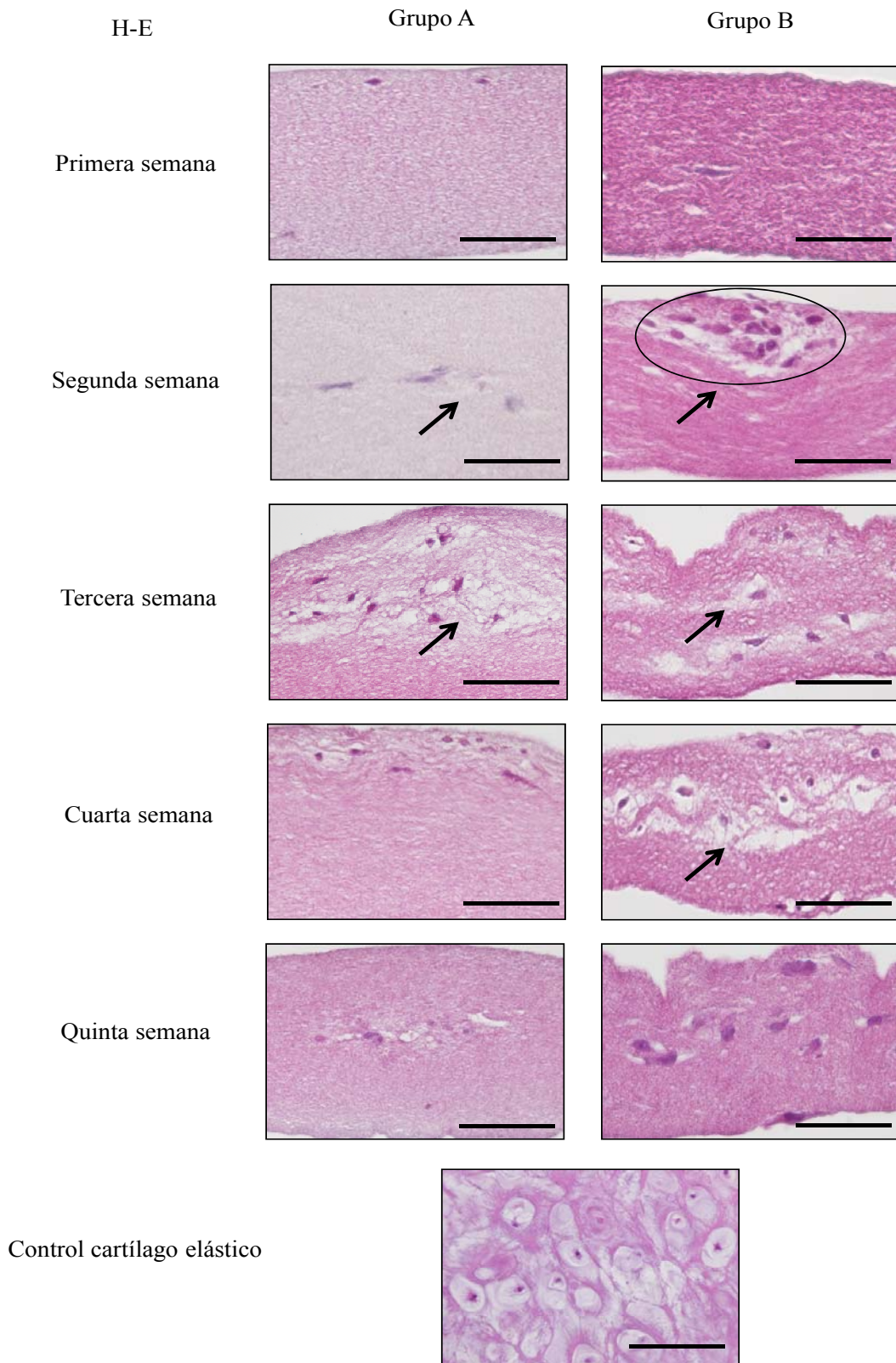


Fig.25 Imagen histológica tinción H-E. En el grupo B se observan los cúmulos celulares (círculo negro) y la degradación del biomaterial señalada con una flecha negra. Magnificación 40X. Barra calibradora 100µm.

4.4 Resultados histoquímicos e inmunohistoquímicos de la interacción célula-biomaterial.

Para comprobar que los condrocitos encapsulados en las matrices de fibrina-agarosa conservaron su expresión fenotípica, se identificó la proteína S100 mediante técnicas de inmunohistoquímica. Además, se comprobó el origen mesenquimal de las células, a través de la identificación de Vimentina.

La reacción para la proteína S100 y Vimentina fue intensa en ambos grupos, durante las 5 semanas de evaluación *in vitro*. Se observó una menor expresión en la primera semana, la cual fue aumentando de manera directamente proporcional al tiempo de cultivo. Además, en el grupo A se observó una expresión menor que en el grupo B. La reacción intensamente positiva para la proteína S100 (Fig.26) y la Vimentina (Fig.27), demuestran que durante el periodo de estudio las células conservaron su expresión fenotípica.

Una vez comprobado que los condrocitos encapsulados en la matriz nanoestructurada de fibrina-agarosa mantenían su expresión fenotípica y linaje condrogénico, se procedió a evaluar la proliferación celular a través de la identificación de la proteína PCNA. (Fig.28). En este sentido, los condrocitos encapsulados fueron capaces de proliferar en ambos grupos de estudio de manera proporcional al tiempo, sin embargo, se observaron ligeras diferencias.

En el grupo A se observó mediante análisis cuantitativos, que la proliferación celular disminuyó de manera significativa desde la primera semana donde el índice fue del 100% hasta la quinta semana donde resultó en 86% de células proliferando. El valor más bajo se obtuvo en la tercera semana con un 59% de células positivas, pero la

proliferación comenzó a aumentar de nuevo en la cuarta y quinta semana y de manera estadísticamente significativa ($\square < 0,05$). En el grupo B la proliferación celular mostró un patrón similar, esta disminuyó significativamente ($\square < 0,05$) desde la primera a la quinta semana de cultivo. Al igual que en el grupo A hubo un incremento entre la cuarta y quinta semana, pero este no fue un aumento estadísticamente significativo ($\square > 0,05$) (Graf.2).

Al comparar el índice de proliferación celular entre ambos grupos, en el grupo A se observan los más altos valores de proliferación en las cinco semanas.

Por otra parte, el análisis inmunohistoquímico de Cortactina, mostró una reacción positiva a nivel citoplasmático, observable en ambos grupos de estudio A y B, y comparable con el control, ya que muestra un patrón similar al observado en el cartílago elástico nativo (Fig.29).

Los condrocitos encapsulados en los hidrogeles nanoestructuradas de fibrina-agarosa, fueron capaces de mantener y generar las organelas mitocondriales. En el análisis inmunohistoquímico de la mitocondria, se obtuvo reacción positiva desde la primera semana en el grupo B y desde la segunda semana en el grupo A (Fig.30).

En el grupo B, se observó una reacción más intensa, especialmente en las zonas donde las células formaron cúmulos. Es necesario señalar, que la reacción positiva fue más intensa en el grupo B, que en el grupo A e inclusive el grupo control, en el cual se observó una reacción más débil.

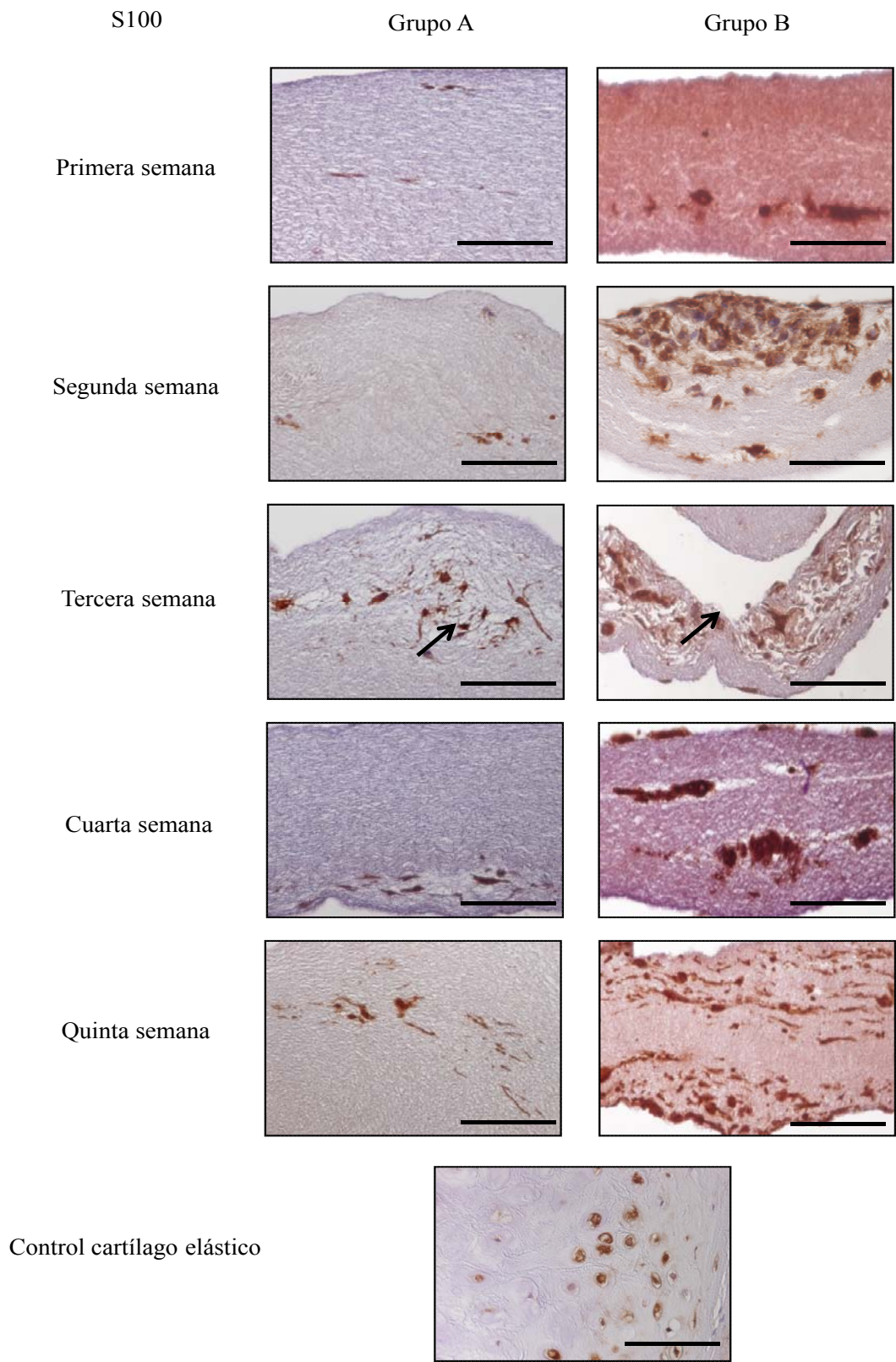


Fig.26 Inmunohistoquímica de proteína S100. En esta imagen se observa la expresión de la proteína S100 en el Grupo A y Grupo B durante las cinco semanas de estudio. Magnificación 40X. Barra calibradora 100µm.

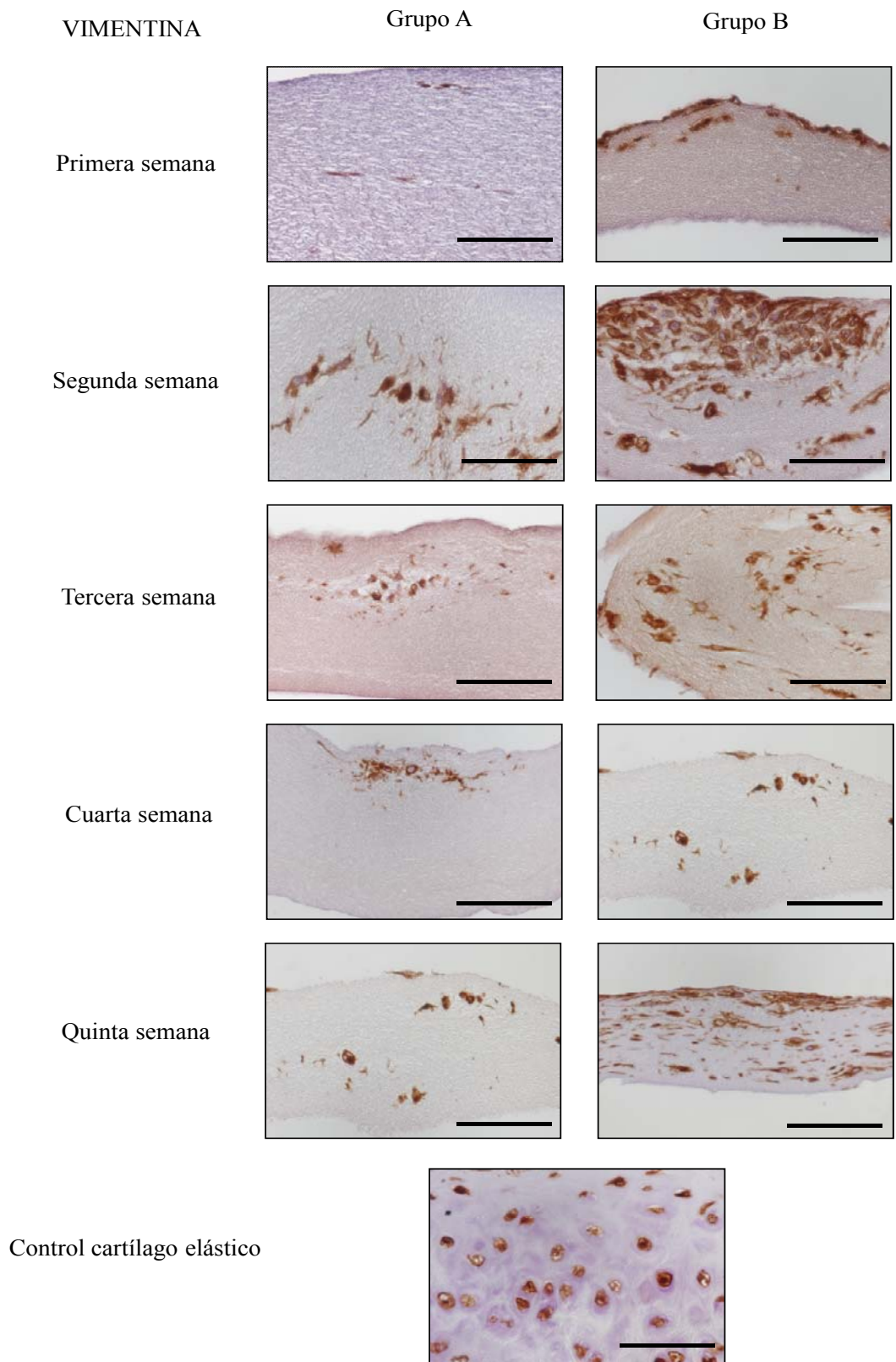


Fig.27 Inmunohistoquímica de proteína Vimentina. En esta imagen se observa la expresión de Vimentina en el Grupo A y Grupo B durante las cinco semanas de estudio. Magnificación 40X. Barra calibradora 100µm.

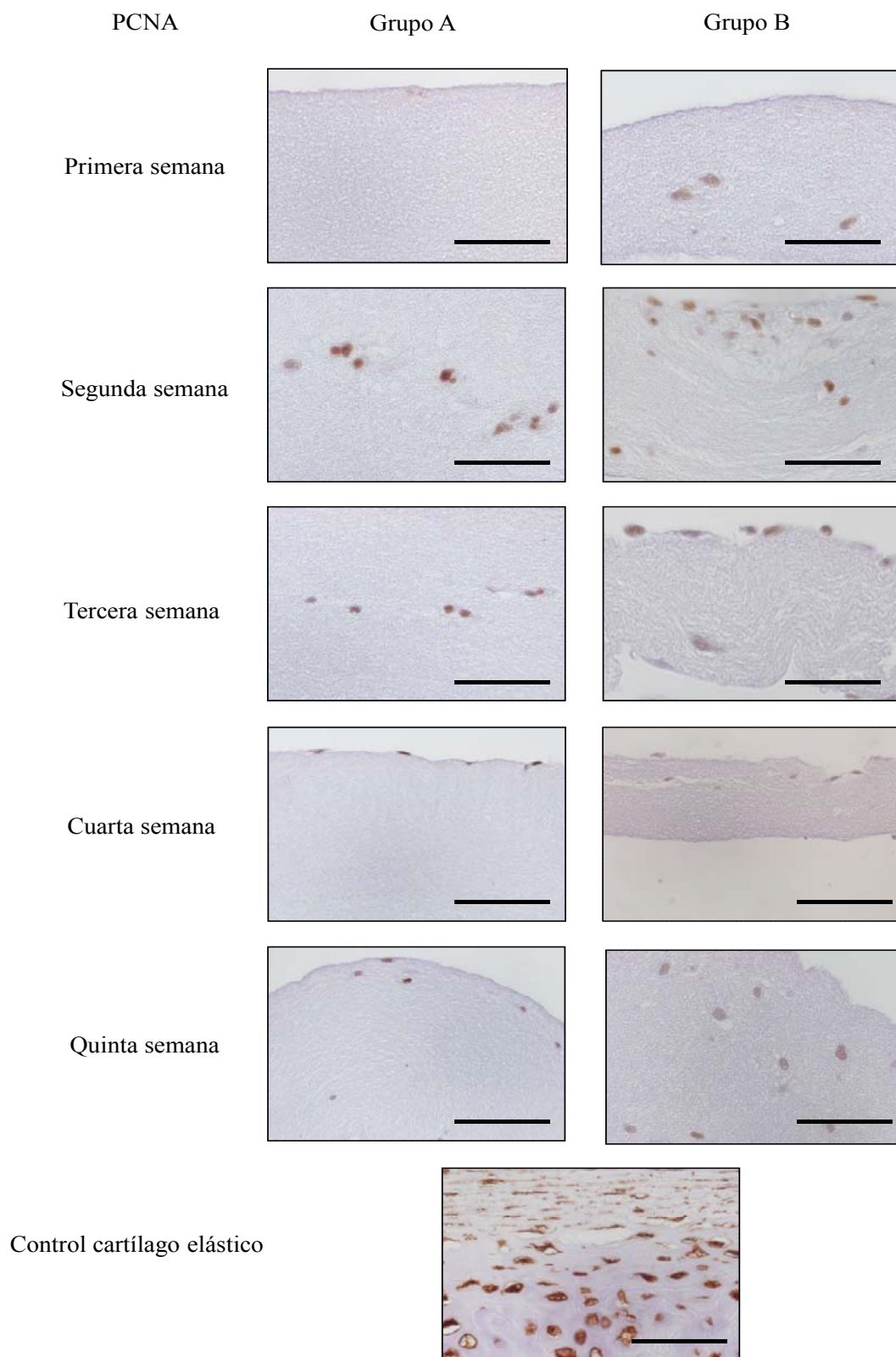
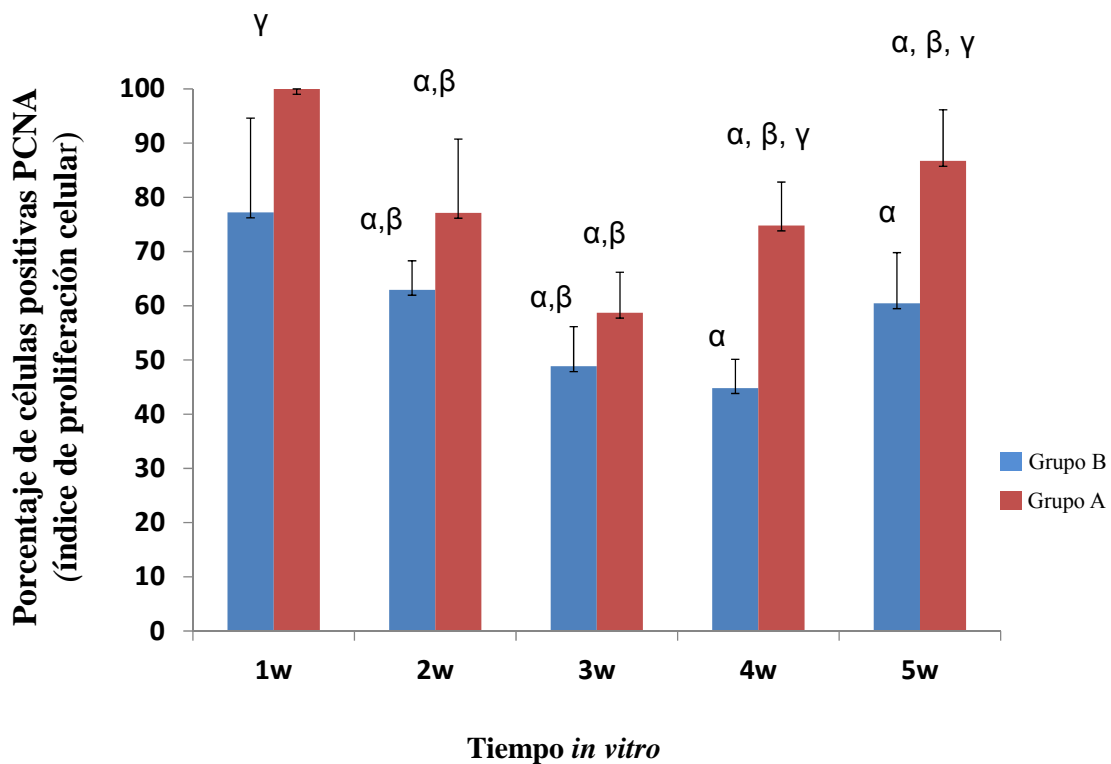


Fig.28 Inmunohistoquímica de proteína PCNA. En esta imagen se observa la expresión de PCNA en el Grupo A y Grupo B durante las cinco semanas de estudio. Magnificación 40X. Barra calibradora 100µm.



Gráf.2 Representación del índice de proliferación celular en ambos grupos experimentales durante las cinco semanas. Se observa la disminución de la proliferación para posteriormente aumentar, esto se observa en ambos grupos. α = Diferencias en la primera semana para ambos grupos fue estadísticamente significativa. β = Diferencias con respecto a la semana anterior, en cada grupo fue estadísticamente significativa γ = Diferencias entre el grupo A y B en cada semana fueron estadísticamente significativa.

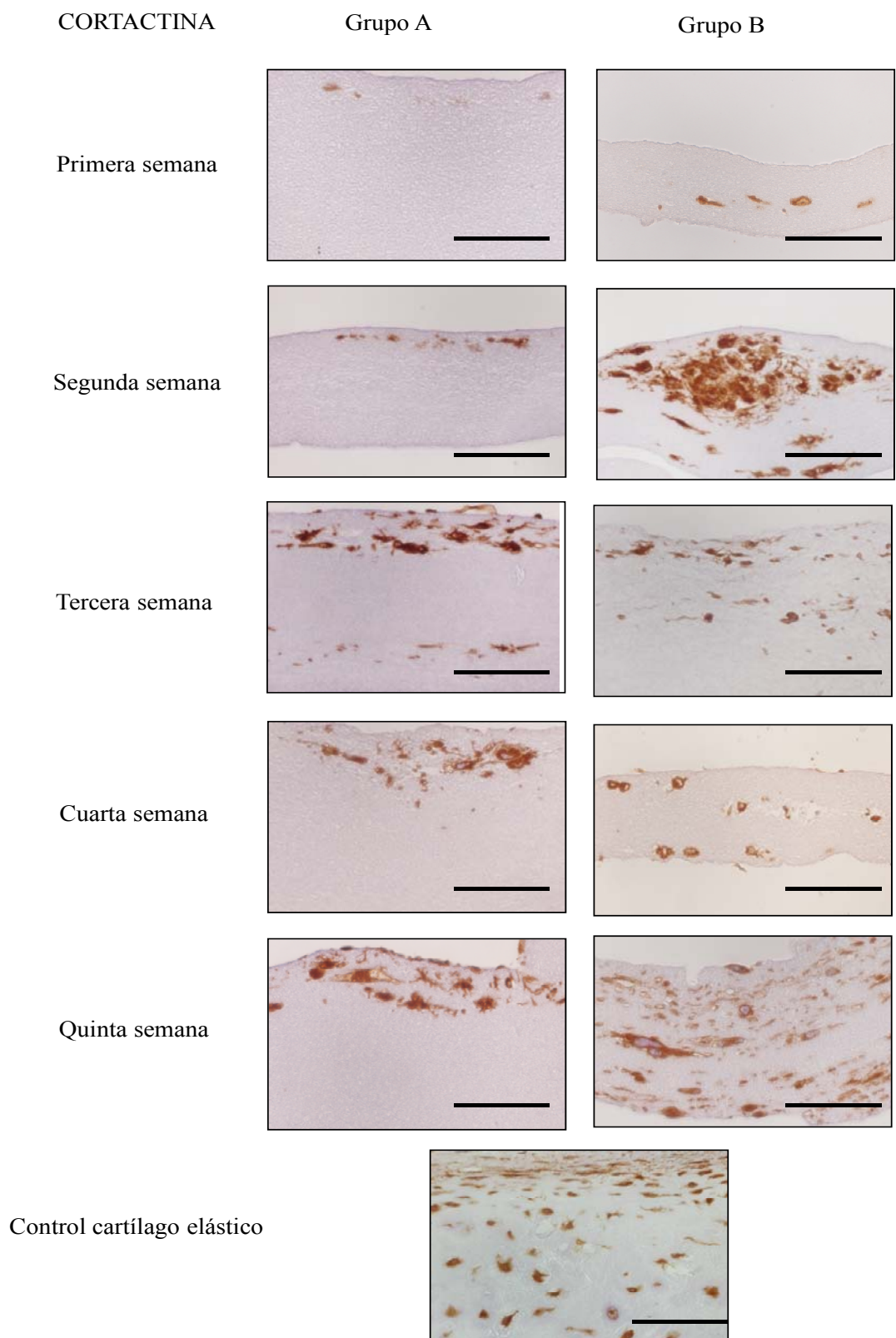


Fig.29 Inmunohistoquímica de proteína Cortactina. En esta imagen se observa la expresión de Cortactina en el Grupo A y Grupo B durante las cinco semanas de estudio. Magnificación 40X. Barra calibradora 100 μ m.

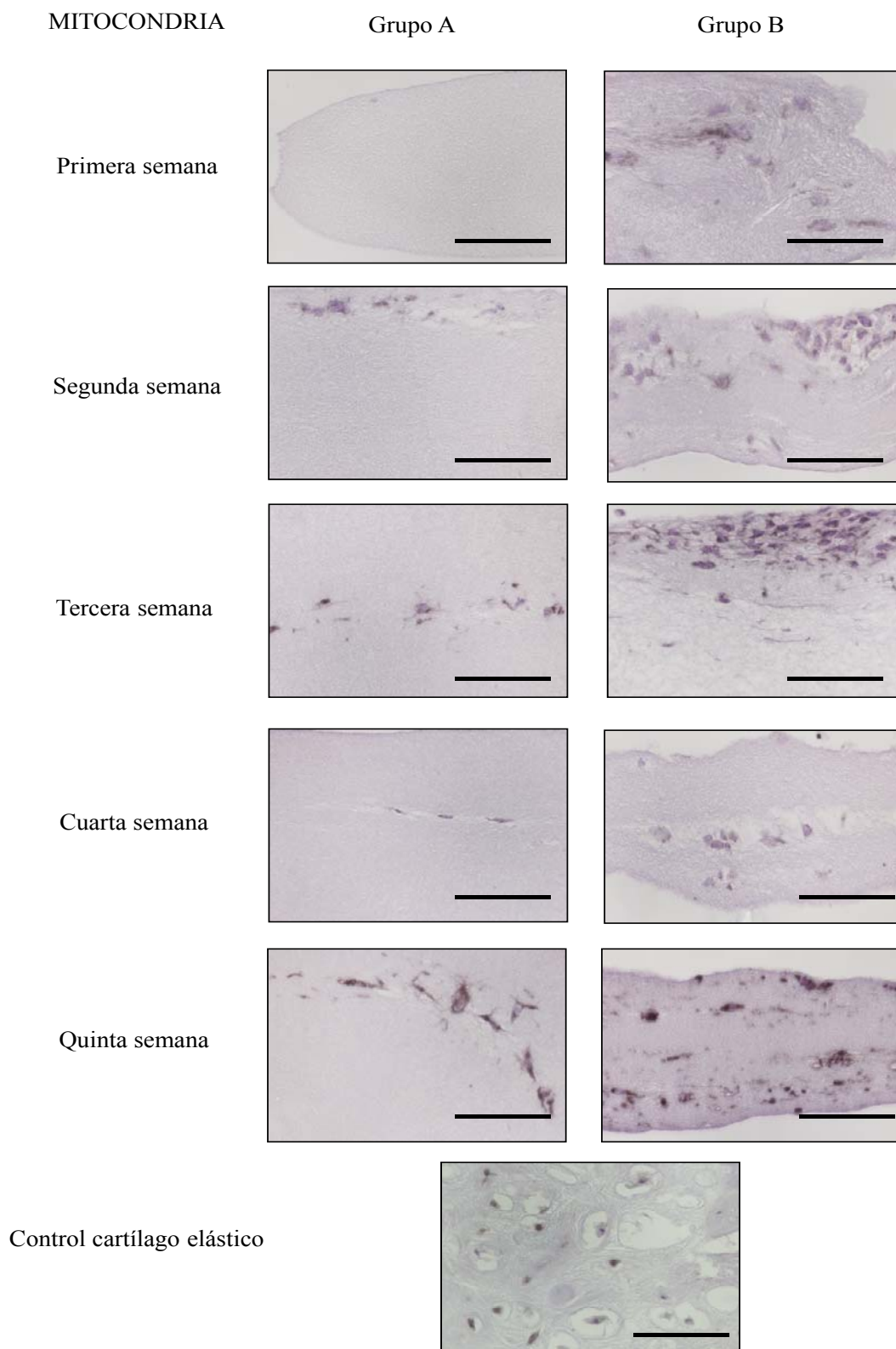


Fig.30 Inmunohistoquímica anti-Mitocondria. En esta imagen se observa la presencia de Mitocondrias en el Grupo A y Grupo B durante las cinco semanas de estudio. Magnificación 40X. Barra calibradora 100µm.

El componente fibrilar del cartílago elástico, está constituido por fibras colágenas y principalmente por fibras elásticas. En este sentido, se observó mediante la técnica histoquímica de Orceína, la síntesis de fibras elásticas por los condrocitos encapsulados en los constructos nanoestructurados de fibrina-agarosa.

Se observó que la reacción fue intensa en el grupo control y en ambos grupos experimentales. En el grupo A, la síntesis de fibras elásticas comenzó a partir de la tercera semana, donde se observó una leve reacción positiva. En el grupo B, la síntesis de fibras elásticas por los condrocitos, se inició en la primera semana, observándose una intensa reacción positiva en las zonas donde se encuentran los cúmulos celulares (Fig.31).

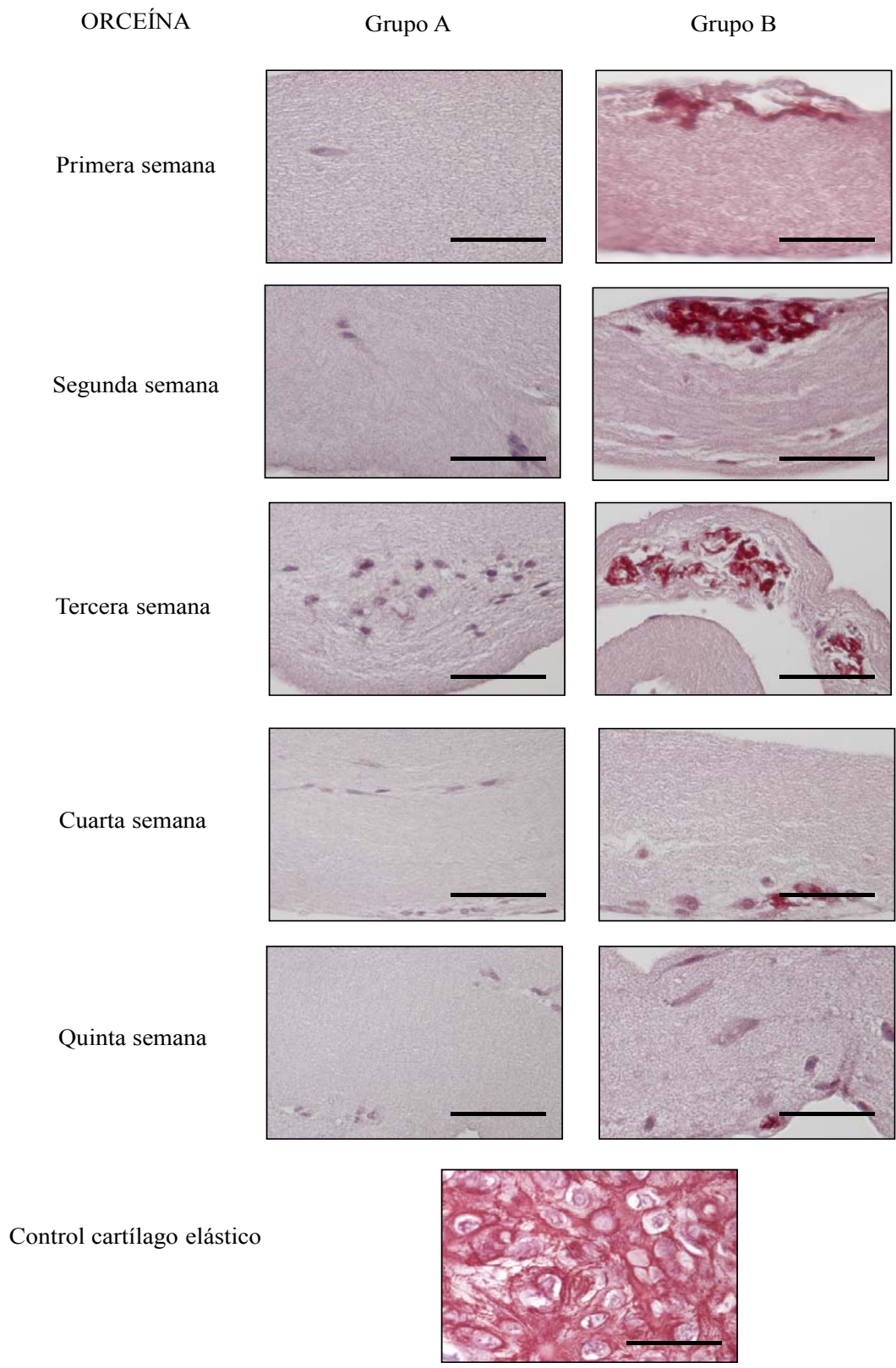


Fig.31 Histoquímica de Orceína. En esta imagen se observa la síntesis de fibras elásticas en el Grupo A y Grupo B durante las cinco semanas de estudio Magnificación 40X. Barra calibradora 100µm.

Dada la importancia de las fibras colágenas en la composición de la MEC, estas se identificaron mediante técnicas de inmunohistoquímica para Colágeno I y Colágeno II.

La expresión del Colágeno I fue positiva en el cartílago elástico nativo como en ambos grupos experimentales.

En el grupo A la expresión de Colágeno I se observó a partir de la segunda semana, presentándose un ligero incremento en el tiempo, siendo además más intensa la reacción en las zonas donde existen cúmulos de células. Por otra parte, en el grupo B, la reacción fue más intensa y la síntesis de colágeno I comenzó desde la primera semana. Cabe destacar que la expresión positiva de colágeno I, presente en ambos grupos experimentales, se observó extracelularmente y algunas células mostraron reacción positiva a nivel del citoplasma (Fig.32).

Las proteínas fibrilares de colágeno II conforman la mayor parte de las fibras colágenas existentes en la MEC, y son las que le confieren principalmente las características biomecánicas al cartílago.

Al identificar las fibras de colágeno tipo II mediante técnicas de inmunohistoquímica, se observó que la reacción fue positiva en el tejido nativo y en ambos grupos experimentales. Sin embargo, la expresión de colágeno tipo II, así como su distribución e intensidad, fue menor que la expresada por el colágeno tipo I en los grupos experimentales.

La síntesis y expresión de colágeno tipo II comenzó a partir de la segunda semana tanto para el grupo A como para el grupo B, siendo más abundante en el grupo B (Fig.33).

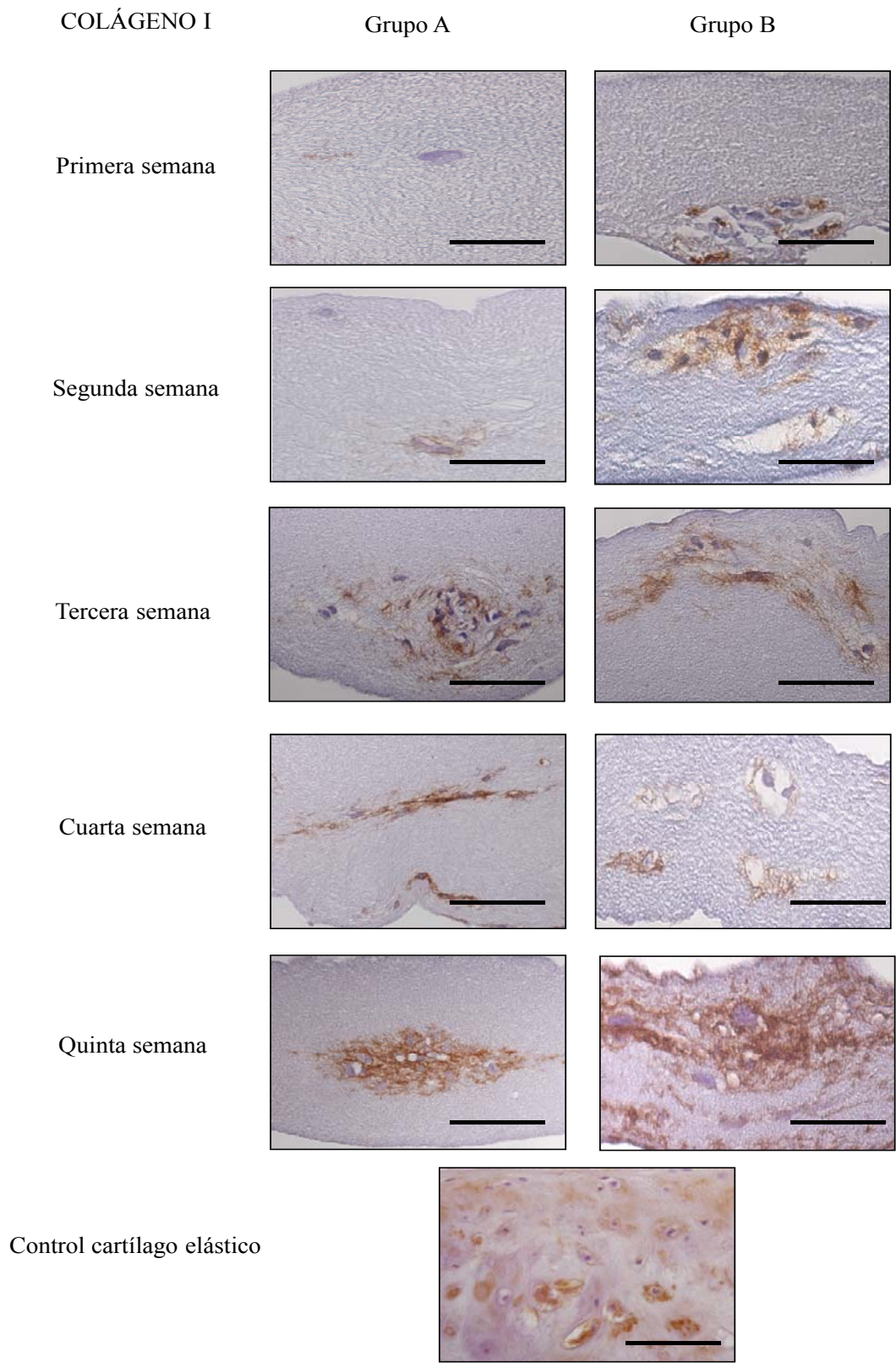


Fig.32 Inmunohistoquímica Colágeno I. En esta imagen se observa la expresión de fibras de colágeno I en el Grupo A y Grupo B durante las cinco semanas de estudio. Magnificación 40X. Barra calibradora 100µm.

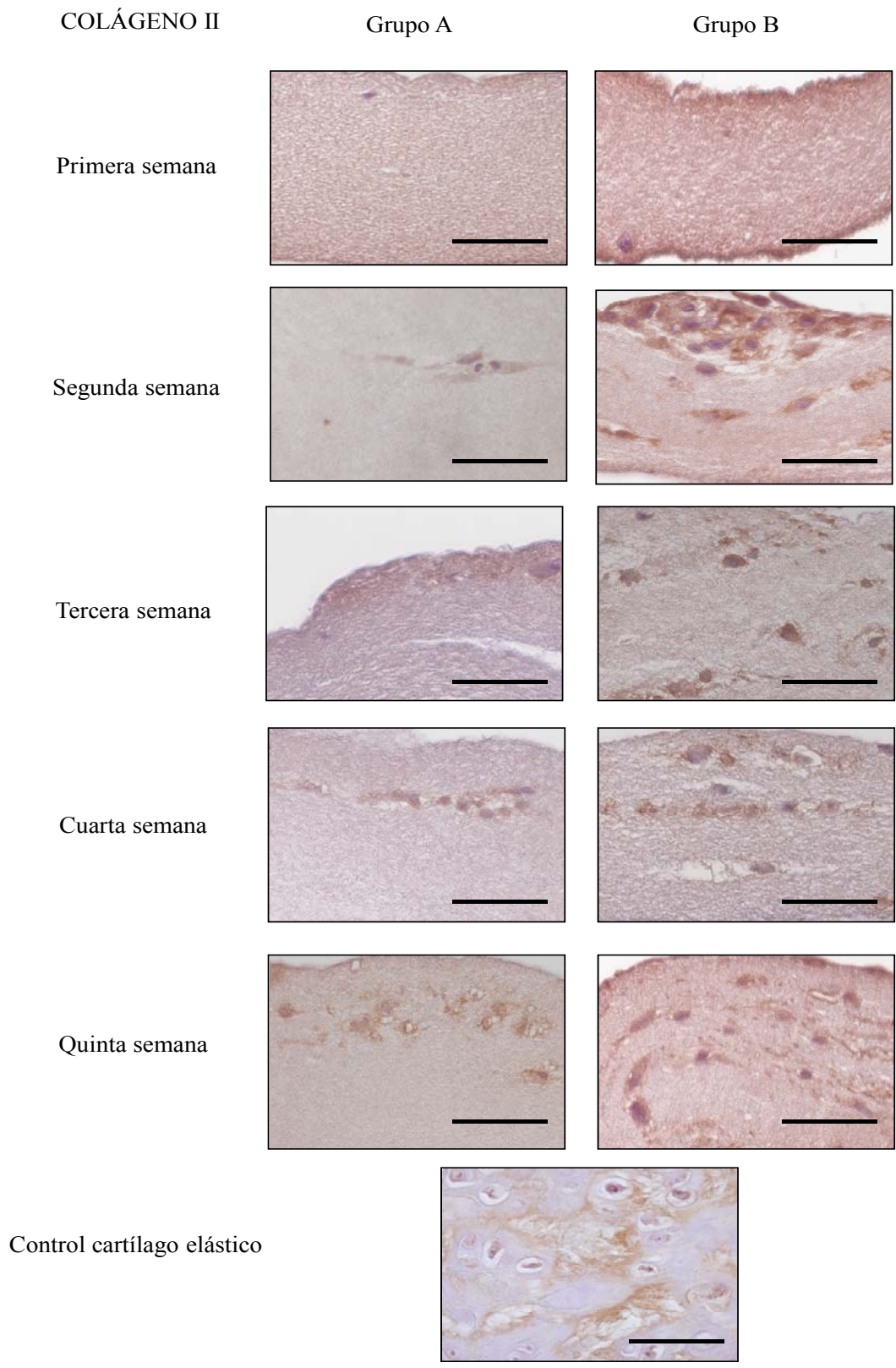


Fig.33 Inmunohistoquímica Colágeno II. En esta imagen se observa la expresión de fibras de colágeno II en el Grupo A y Grupo B durante las cinco semanas de estudio. Magnificación 40X. Barra calibradora 100µm.

Además del componente fibrilar de la MEC del cartílago elástico, existe un componente no fibrilar compuesto principalmente por agua, proteoglicanos, GAGs y glicoproteínas. Los proteoglicanos le confieren a la MEC estructura, junto a las fibras colágenas y son también responsables de conferirles ciertas propiedades biomecánicas. Así mismo, intervienen en diversas funciones de interacción célula-célula y célula-MEC.

Mediante técnicas histoquímicas se evaluó la expresión de los proteoglicanos en la MEC, producida por los condrocitos encapsulados en los constructos nanoestructurados de fibrina-agarosa.

En la técnica histoquímica mediante tinción de Azul Alcian, los resultados revelaron una reacción positiva en la zona extracelular del cartílago elástico control. En los grupos experimentales A y B, se observó una ligera marcación, especialmente en las zonas que presentaron cúmulos celulares, sin embargo no se observaron grandes diferencias entre ambos grupos (Fig.34).

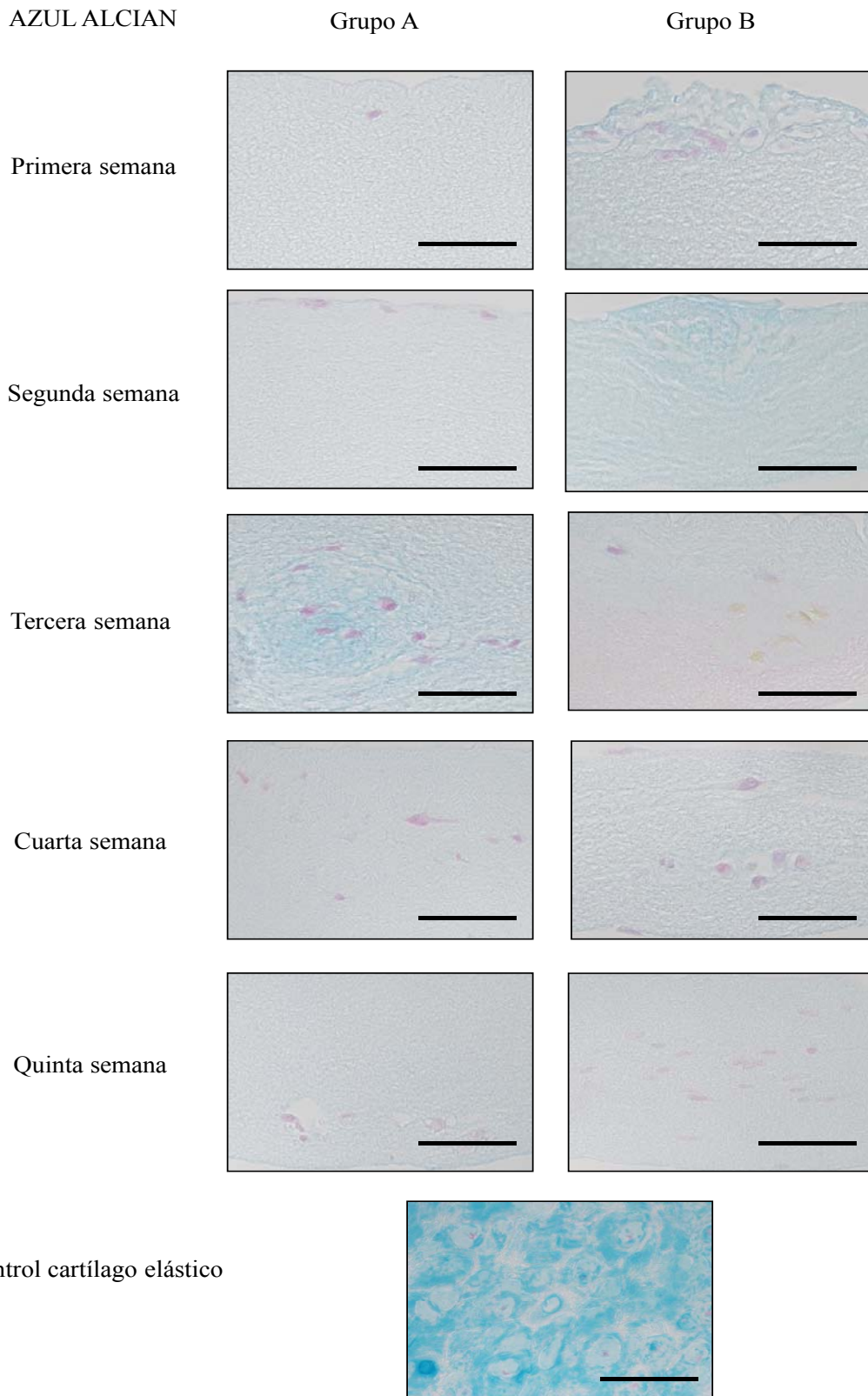


Fig.34 Histoquímica tinción con Azul Alcian. En esta imagen se observa la síntesis de proteoglicanos producida por los condrocitos tanto en el Grupo A como el Grupo B durante las cinco semanas de estudio. Magnificación 40X. Barra calibradora 100µm.

Para la identificación del proteoglicano agrecano, se evaluó su expresión mediante técnica inmunohistoquímica. La reacción fue positiva para el grupo control de cartílago elástico, y en ambos grupos experimentales.

Por otra parte, la mayor reacción positiva para el agrecano, se observó en el grupo A y grupo B en las zonas donde se formaron grupos celulares (Fig.35).

Otro proteoglicano estudiado el biglicano fue identificado observándose reacción positiva, en el grupo control y en ambos grupos experimentales. La síntesis y expresión del biglicano, se observó a partir de la segunda semana y se localizó especialmente en la zona pericelular en ambos grupos (Fig.36). El patrón de expresión de biglicano es comparable con los patrones de colágeno I y II sintetizados.

La síntesis del versicano fue evaluada mediante inmunohistoquímica. La reacción positiva se observó de manera intensa en la zona del pericondrio en el cartílago elástico nativo, esa intensidad disminuyó presentándose más débil en la zona de los condrocitos maduros.

En el grupo A, versicano fue sintetizado desde la primera hasta la quinta semana. Y en el grupo B, la reacción fue más intensa en las dos primeras semanas. La expresión de Versicano tiende a disminuir con el tiempo (Fig.37).

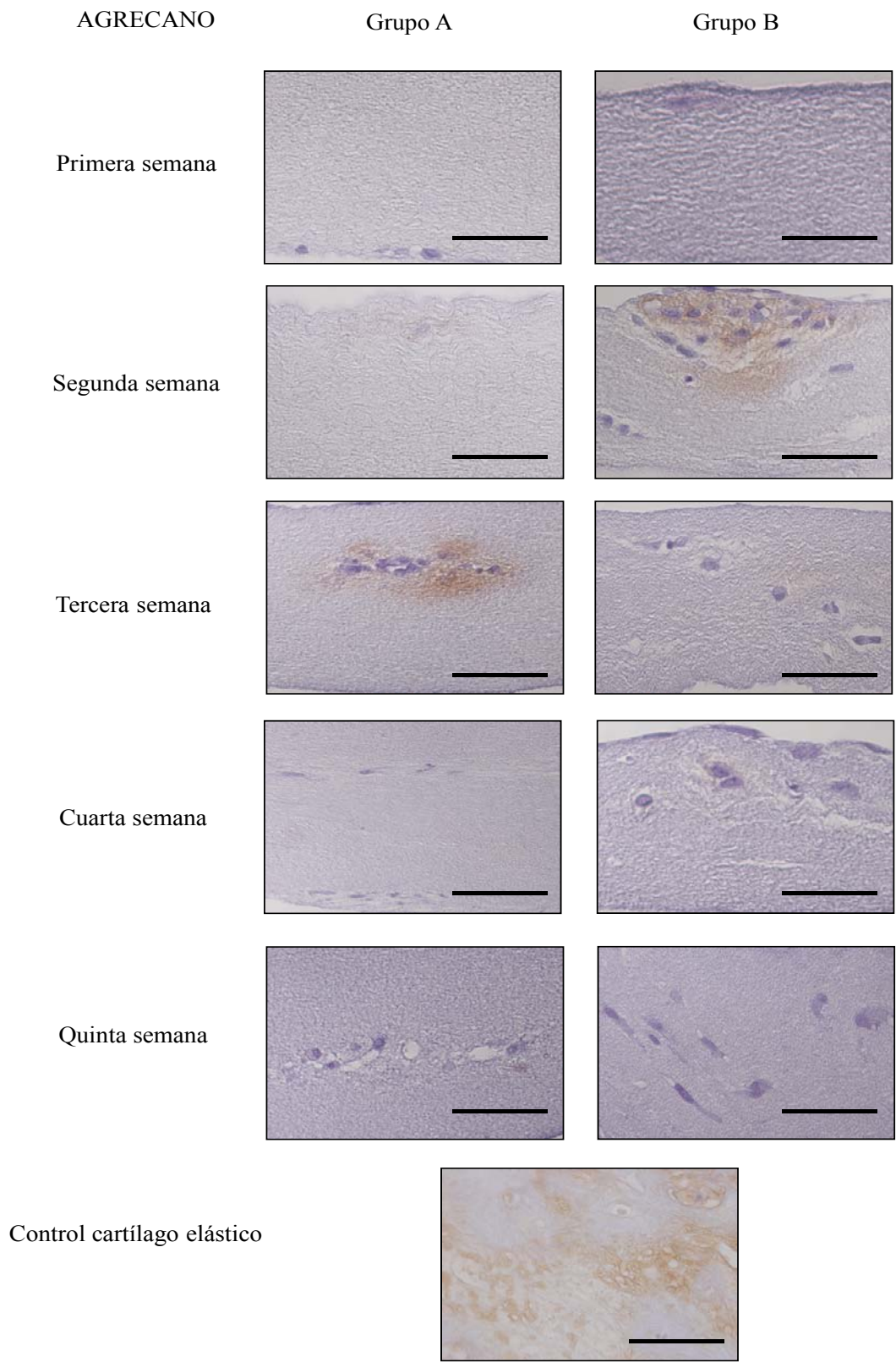


Fig.35 Inmunohistoquímica de Agrecano. En esta imagen se observa la expresión positiva de Agrecano en el Grupo A y Grupo B durante las cinco semanas de estudio. Magnificación 40X. Barra calibradora 100µm.

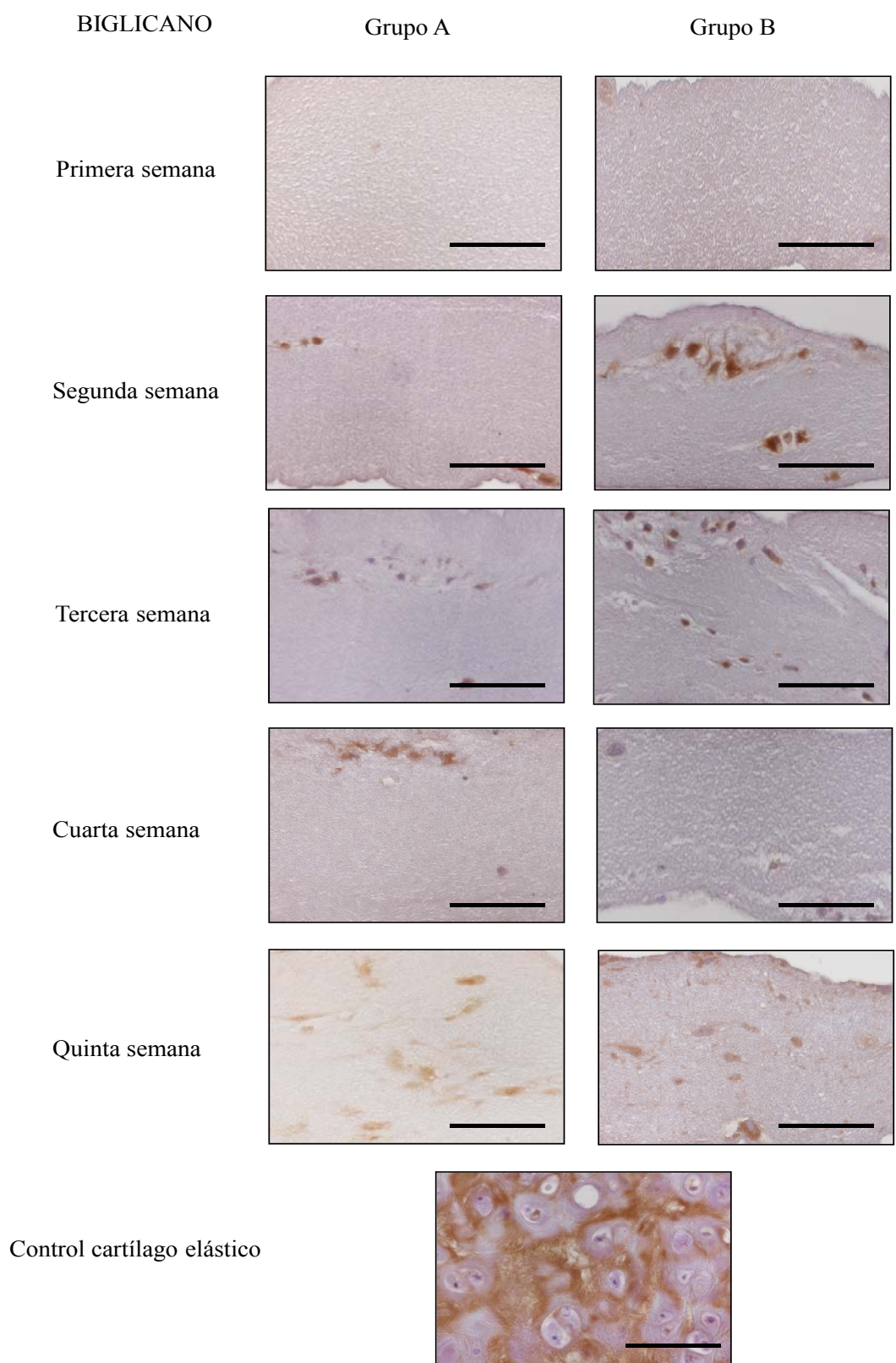


Fig.36 Inmunohistoquímica de Biglicano. En esta imagen se observa la expresión positiva de Biglicano en el Grupo A y Grupo B durante las cinco semanas de estudio. Magnificación 40X. Barra calibradora 100µm.

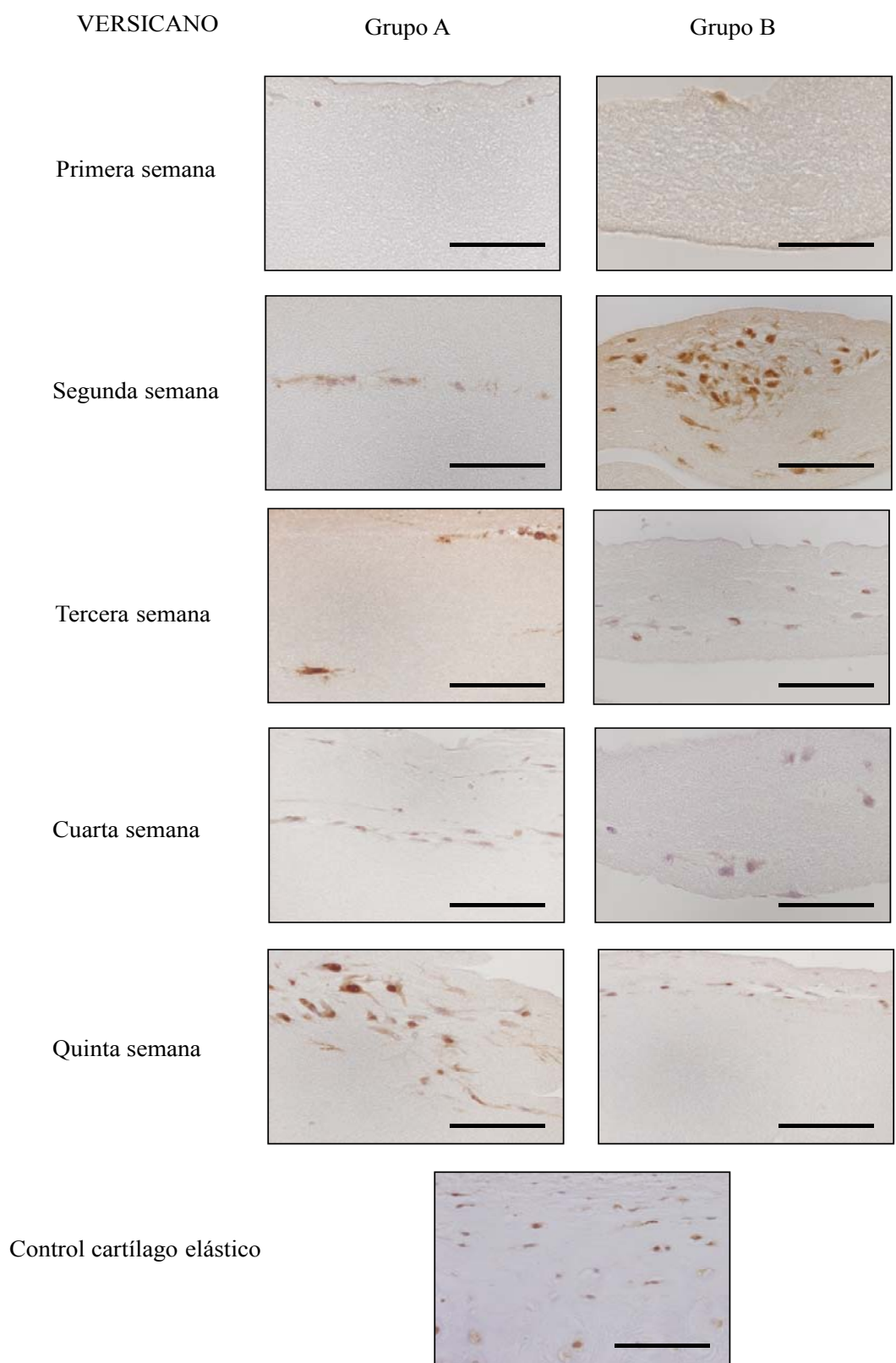


Fig.37 Inmunohistoquímica de Versicano. En esta imagen se observa la expresión positiva de Versicano en el Grupo A y Grupo B durante las cinco semanas de estudio. Magnificación 40X. Barra calibradora 100m.

DISCUSIÓN

La Ingeniería Tisular ha surgido como una disciplina biomédica, mediante la cual se pueden crear diversos tipos de tejidos artificiales. La Ingeniería Tisular se basa en la utilización de distintos tipos de fuentes celulares, biomateriales y factores de estimulación.

La generación de tejidos artificiales surge como una alternativa terapéutica que busca dar solución a patologías que afectan a diferentes tejidos humanos y que causan gran porcentaje de morbi-mortalidad. Esta alternativa surgió debido a que en la actualidad los tratamientos convencionales utilizados para tratar o sustituir los tejidos afectados, aunque en ocasiones brindan resultados óptimos, estos no son duraderos en el tiempo. Entre los tejidos más afectados en la población a nivel mundial, se encuentra el tejido cartilaginoso. Este tipo de tejido conectivo especializado en sus distintas variedades se ve afectado por diferentes causas como son las lesiones neoplásicas benignas y malignas [182-187], los traumatismos, las enfermedades osteodegenerativas, autoinmunes [188-190], y por último algunas patologías congénitas [191].

Debido a la alta prevalencia de estas lesiones y la baja efectividad de los tratamientos actuales, la Ingeniería Tisular surge como una alternativa médica mediante la cual se pueda generar un sustituto cartilaginoso que pueda brindar una alternativa terapéutica a estos pacientes, con una mejora en la eficacia, en comparación con los tratamientos actuales.

En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado un biomaterial, un hidrogel de origen natural y nanoestructurado compuesto por fibrina y agarosa (HNFA). El objetivo general fue determinar si el HFA es un biomaterial idóneo para la encapsulación de condrocitos humanos derivados de cartílago elástico (CHDCE), con el propósito de generar un sustituto funcional de cartílago elástico mediante Ingeniería Tisular.

Para la Ingeniería Tisular del cartílago, es necesario obtener una fuente celular que tenga las siguientes características, las células deben ser de fácil aislamiento, cultivo y expansión *in vitro* [119], además estas células deben de tener la capacidad de sintetizar los diferentes componentes de la MEC [119]. Tomando en cuenta estas condiciones, numerosas fuentes celulares han sido analizadas para la generación de cartílago mediante técnicas de Ingeniería Tisular. En este sentido, los condrocitos son las células más efectivas y consideradas el *Gold standard* de la terapia celular de lesiones que afectan al tejido cartilaginoso [83, 89, 93, 192, 193] y las más estudiadas para la regeneración del cartílago [194]. Sin embargo, los condrocitos tienen cierta inestabilidad al ser cultivadas *in vitro* y tienden a perder su expresión fenotípica en un proceso llamado desdiferenciación, dando como resultado una menor producción de los componentes de la MEC. Por otra parte, para la obtención de condrocitos se requiere de la extirpación de tejido sano con la consecuente morbilidad de la zona donante [119]. Los condrocitos utilizados para Ingeniería Tisular han sido aislados de diferentes zonas anatómicas, como el cartílago articular, el septum nasal, las costillas y del pabellón auricular [195, 196]. Estos condrocitos obtenidos de diversas fuentes, han sido utilizados tanto para terapia celular (ACI), como para la generación de sustitutos de cartílago mediante Ingeniería Tisular [119, 195]. Los condrocitos obtenidos de las distintas variedades de tejido cartilaginoso presentan diferencias en cuanto a actividad metabólica y expresión génica, además, la MEC que producen y en la cual están inmersos, es altamente específica para cada tipo de cartílago, presentando diferencias moleculares y biomecánicas [119]. Sin embargo, y a pesar de las limitaciones de los condrocitos, estos continúan siendo la fuente celular idónea para ser utilizada en la Ingeniería Tisular del cartílago.

Actualmente existen otras fuentes celulares que está siendo ampliamente utilizadas en la Ingeniería Tisular del cartílago como son las células madre mesenquimales (CMM). Las CMM tienen una serie de ventajas, entre las cuales destacan su fácil obtención en grandes cantidades, alta capacidad de proliferación y expansión y proliferación *in vitro* y además poseen baja inmunogenicidad [197, 198]. Pueden obtenerse de diferentes tejidos, como la médula ósea, tejido adiposo, sinovia, periostio, cordón umbilical, placenta y pulpa dental [197, 199, 200]. En este sentido, para la Ingeniería Tisular del cartílago han sido utilizadas CMM de la médula cultivadas en 3D, utilizando biomateriales y estimuladas mediante diversos factores [197, 201]. Sin embargo, estas células tienen la desventaja de desdiferenciarse *in vitro* [202] y la MEC sintetizadas por ellas poseen bajas propiedades mecánicas [203]. Existe además otro factor limitante, la obtención de estas células conlleva a un proceso de gran morbilidad para el donador [197].

En este sentido, otra línea celular mesenquimal estudiada, han sido las CMM del tejido adiposo, siendo células de fácil aislamiento, gran disponibilidad y gran potencial para diferenciarse [197]. Además, poseen potencial condrogénico, cuando son expandidas bajo las condiciones apropiadas [204], pero este potencial es menor que las CMM derivadas de la médula ósea [205].

Además de las líneas celulares anteriormente mencionadas, se encuentran las células madre embrionarias que aunque han demostrado tener la capacidad de sintetizar MEC sin generar teratomas [125], existe un componente ético para su uso, ya que proceden del blastocito.

Recientemente se están estudiando las células madre pluripotentes inducidas, aunque son una fuente celular prometedora para la generación de cartílago, presentan inconvenientes al ser cultivadas *in vitro*, y producen malformaciones en los tejidos *ex*

vivo[194]. Actualmente para la generación de cartílago artificial, se están llevando a cabo estudios con técnicas de co-cultivos celulares de CMM y condrocitos [206].

Cabe destacar que, aunque existen diversas fuentes celulares que están siendo empleadas para la generación de cartílago mediante Ingeniería Tisular, la célula más idónea siguen siendo los condrocitos, ya que son las únicas células presentes en el cartílago que producen y mantienen la MEC, confiriéndole las propiedades mecánicas al tejido, y son capaces de proliferar y mantener su actividad metabólica en un ambiente hipóxico [194].

Es importante señalar que todas las fuentes celulares mencionadas anteriormente, han sido estudiadas y empleadas en la regeneración de cartílago hialino, específicamente de cartílago articular [207, 208]. Actualmente existen algunos estudios sobre la utilización de este tipo de células para la regeneración de cartílago elástico[209]. Por otra parte, la mayoría de los condrocitos utilizados han sido condrocitos diferenciados provenientes de animales, o condrocitos humanos fetales, en pocos casos se han utilizado condrocitos humanos adultos [210].

En este sentido cabe destacar que en la presente Tesis Doctoral, la fuente celular utilizada fueron condrocitos humanos derivados de cartílago elástico (CHDCE).

En esta Tesis Doctoral, los condrocitos fueron aislados a través de digestión enzimática con colagenasa tipo II de acuerdo a el protocolo previamente establecido [156].

La digestión de la MEC cartilaginosa con colagenasa tipo II ha sido ampliamente utilizada para el aislamiento de estas células [77, 115, 211-215], y tiene su base en que la principal fibra de la MEC son las fibras colágenas tipo II.

Otros autores han realizado el aislamiento de condrocitos empleando otras enzimas como la colagenasa I [216], tripsina, hialuronidasa y pronasa [217-219].

Una vez realizado el aislamiento celular, se procedió a la selección de los condrocitos más viables y funcionales para su encapsulación en los HFA. Para realizar esta selección, se determinó la viabilidad celular en los diez pases con el kit comercial de Live/Dead® assay. Esta prueba mostró una media de viabilidad celular del 97% en los pases analizados, obteniendo la viabilidad más alta en el segundo y octavo pase. Estos índices de alta viabilidad de los condrocitos son comparables con los resultados obtenidos por otros estudios en otras especies [220] e incluso en fibrocartilago humano [156].

Como se mencionó anteriormente, los condrocitos tienden a desdiferenciarse *in vitro* [156, 179, 181], por lo cual se recomienda utilizar los condrocitos viables que correspondan a los primeros pases de cultivo los cuales poseen una menor desdiferenciación [80, 156, 180, 181]. En este sentido, Huang et al. estudiaron los efectos que tienen la utilización de diversos pases de cultivos de condrocitos en la formación de cartílago y su utilización en Ingeniería Tisular [221].

Basados en estas recomendaciones, en los estudios experimentales desarrollados en la presente Tesis Doctoral, se utilizaron condrocitos con alta viabilidad y del pase dos. En algunos estudios se han realizado pruebas de viabilidad celular de los condrocitos mediante Live/Dead® assay [115, 212], y otros mediante azul tripán [213, 214] pero son pocos los estudios que muestran que estas pruebas de viabilidad han sido realizadas previamente a la utilización de las células para fabricación de constructos.

Cabe destacar, la importancia de realizar las pruebas de viabilidad celular previamente a la selección de las células para su uso en Ingeniería Tisular, de esta manera se seleccionarán células sin daños estructurales ni alteraciones metabólicas o fenotípicas. Como se mencionó anteriormente la Ingeniería Tisular está fundamentada en tres pilares, el uso de fuentes celulares, los biomateriales y los factores de estimulación. Una vez seleccio-

nada la población viable de CHDCE procedentes del pase dos, se procedió a su encapsulación en el HFA. Una vez encapsulados, los constructos fueron nanoestructurados con el objetivo de incrementar sus propiedades biomecánicas y estructurales.

En Ingeniería Tisular de cartílago, se han empleado distintos tipos de biomateriales, para la encapsulación de condrocitos, sin embargo, estos biomateriales deben presentar ciertas características para poder promover la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Los biomateriales deben ser biocompatibles, para integrarse fácilmente al tejido que lo rodea, debe ser biodegradable para promover la regeneración del tejido circundante, además, los productos resultados de su degradación no deben ser tóxicos. La superficie, composición y organización 3D de los biomateriales, deben promover funciones celulares como la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular. Por otra parte, los biomateriales deben poseer propiedades mecánicas similares al tejido, con ciertos parámetros geométricos que permitan la nutrición celular [116].

Para la Ingeniería Tisular de cartílago han sido utilizados biomateriales naturales, sintéticos y mixtos. Los biomateriales naturales son altamente hidratados (hidrogeles) y poseen estructura tridimensional favoreciendo a la adhesión y proliferación celular [222]. Sin embargo, poseen bajas propiedades biomecánicas, y se degradan con rapidez [116]. Entre los biomateriales naturales utilizados están los basados en celulosa [223], colágeno, ácido hialurónico, quitosano [212, 220, 224-228], gelatina, hidrogeles basados en polisacáridos como el alginato y la agarosa [229, 230], hidrogeles de polímeros como el ácido plurónico [231, 232], geles basados en proteínas como el colágeno, la fibrina y la seda [116, 130, 226, 227, 233-236]. Sin embargo, aunque se han desarrollado diferentes biomateriales naturales, estos presentan ciertas condiciones que no lo hacen ser un biomaterial idóneo, entre los más estudiados se encuentra el alginato que promueve una pobre adhesión celular [80]. En el caso del colágeno, promueve una

eficaz adhesión y proliferación celular, sin embargo tiene como desventaja que se contrae *in vitro* [237]. Por otro lado, en el caso de la fibrina, presenta una rápida degradación *in vitro*, lo que complica la realización de estudios de larga duración [238, 239].

Por otra parte, entre los biomateriales sintéticos utilizados para la Ingeniería Tisular de cartílago se encuentran el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA), copolímeros de ácido glicólico poliláctico, el polietilenglicol (PEG), poliuretanos [226, 240], y los hidrogeles de alcohol polivinílico [129]. Estos biomateriales sintéticos ofrecen adecuadas propiedades biomecánicas dependiendo de su aplicación y una degradación controlada [241, 242]. Sin embargo, muchos de estos materiales son hidrófobos, por lo cual no interactúan con las células para promover su adhesión, proliferación y/o diferenciación celular. Además, algunos de estos biomateriales sintéticos liberan toxinas o acidifican el microambiente, desencadenando procesos inflamatorios, reacción de cuerpo extraño y en casos más severos necrosis tisular [114, 241-245]. En este sentido, los biomateriales sintéticos de PEG ha sido uno de los más estudiados y modificados, han sido utilizados como soporte para condrocitos y las CMM. Son además, relativamente biocompatibles [246], sin embargo, no ofrece un soporte celular adecuado para la condrogénesis y la síntesis de MEC, en comparación con los biomateriales naturales [133].

En este sentido y con la finalidad de obtener un biomaterial que cumpla con las características idóneas para su uso en Ingeniería Tisular del cartílago, En esta Tesis se ha utilizado el HFA, el cual fue descrito por primera vez en el año 2006 para la construcción de un sustituto corneal completo [140] Este hidrogel es altamente biocompatible y biodegradable, además promueve procesos celulares como la

proliferación, la diferenciación, la migración, y la síntesis de MEC *in vitro* presentando además, altos índices de integración y regeneración tisular *in vivo* [113, 140-143, 247].

Cabe destacar, que los HFA al ser un biomaterial de origen natural es muy biocompatible y por ser un hidrogel, brinda una matriz altamente hidratada lo que favorece a la adhesión celular, al intercambio de nutrientes y eliminación de desechos a través de la misma.

Los HFA han sido utilizados exitosamente para la generación de diversos tejidos artificiales como mucosa oral [248, 249], nervio periférico [141, 247, 250], cornea [140], piel [113], vejiga [251], y en estudios preliminares para su empleo en la generación de tejido óseo y cartílago [145, 252, 253].

Como se ha explicado anteriormente, un inconveniente que presentan los hidrogeles naturales son sus bajas propiedades biomecánicas. Sin embargo, con los HFA se ha utilizado la técnica de nanoestructuración, con la cual se incrementaron significativamente sus propiedades biomecánicas y estructurales. La nanoestructuración es una técnica que se basa en la compresión plástica y deshidratación controlada del hidrogel, de esta manera se forman enlaces entre las fibras modificando su estructura tridimensional y regulando su porosidad [141, 164, 254, 255]. Sin embargo, aunque se producen cambios estructurales y biomecánicos, no se afecta la viabilidad y función celular [144, 254, 256]. Actualmente se están realizando diversos estudios con la finalidad de mejorar aún más las propiedades biomecánicas del HFA para su utilización en diversos tejidos, sin alterar sus propiedades biológicas [257].

Cabe destacar, que en la Presente Tesis Doctoral, se presenta por primera vez la utilización de los HNFA para la encapsulación de CHDCE y su utilización en Ingeniería Tisular de cartílago.

La generación de cartílago artificial mediante técnicas de Ingeniería Tisular, emplea factores de estimulación, siendo principalmente utilizados los factores de crecimiento, los cuales tienen un impacto en el comportamiento celular y en el desarrollo del tejido cartilaginoso[133] y contribuyen a mantener su expresión fenotípica [146]. Entre los factores de crecimiento más utilizados en cartílago se encuentran el factor de crecimiento transformante (TGF β), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), la proteína morfogenética ósea (BMP) y el factor de crecimiento insulínico (IGF) [258, 259]. En este sentido, el TGF β estimula la síntesis de proteoglicanos y colágeno II, además es eficaz en la diferenciación de las CMM a condrocitos *in vitro* [147, 260]. En cuanto a la familia del FGF ha sido usado para mantener la expresión fenotípica de los condrocitos, promover su proliferación y síntesis de MEC [151]. La BMP ha sido empleada para la regeneración de cartílago, estimula la diferenciación condrogénica de las CMM, además promueve la síntesis de agregano y colágeno tipo II por los condrocitos [149]. La IGF es considerado un mediador de la homeostasis del cartílago y su metabolismo, promueve la proliferación celular e induce a la síntesis de proteoglicanos [44, 154].

Los factores de estimulación ya sean factores de crecimiento o estímulos físicos como los bioreactores, buscan acelerar y mejorar la síntesis de MEC por los condrocitos y aumentar su proliferación, y evitar su desdiferenciación o hipertrofia. Es importante señalar que en los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral, no se utilizaron factores de estimulación condrogénicos (físicos y factores de crecimiento), obteniendo resultados muy positivos en cuanto a proliferación y síntesis de los componentes de la MEC, como se señala a continuación.

El análisis de la interacción célula-biomaterial, se llevó a cabo a través de una variedad de técnicas, histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas. Los resultados obtenidos demostraron que los condrocitos encapsulados en los HNFA fueron capaces de

proliferar y formar grupos en el interior del biomaterial. Morfológicamente, los condrocitos perdieron su morfología externa característica (esférica, y rodeada por la cápsula) adquiriendo una forma irregular. Esto aunque puede ser signo de desdiferenciación celular, este el comportamiento de las células de origen mesenquimal en cultivo, además, los condrocitos se mantuvieron sin medios condrogénicos, y sin estimulación mecánica [77, 156, 220], y no han formado la cápsula protectora pericelular. Estos resultados demuestran que el HNFA, promueve la proliferación de los condrocitos *in vitro*.

En relación a los marcadores de estirpe celular, los condrocitos fueron capaces de expresar la proteína S100 y Vimentina confirmando el linaje condrogénico y mesenquimal. La proteína S100 se clasifica en 24 tipos, y es expresada en las células de Schwann [247], melanocitos y condrocitos [162]. La proteína S100 interviene en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, se relaciona con la apoptosis, homeostasis del calcio, el metabolismo celular, interviene además en los procesos de inflamación, migración e invasión celular, mediadas por múltiples proteínas [158].

En el cartílago la proteína S100 se expresa en diferentes estados de maduración del tejido cartilaginoso y en los condrocitos que están cerca de áreas dañadas [162].

En este estudio, la identificación de la proteína S100 permitió comprobar la naturaleza de los condrocitos, lo cual ha sido ratificado previamente por otros autores [218, 261]. En la información respaldada por otros estudios, en los que se demuestra que los condrocitos en proceso de desdiferenciación disminuyen la expresión de la proteína S100 [261]. En este sentido, nuestros resultados positivos y constantes de expresión de la proteína S100 a lo largo del tiempo de estudio (5 semanas *in vitro*) y en ambos grupos, grupo A (4.500 CHDCE/mL) y grupo B (45000 CHDCE/mL) confirman que los condrocitos mantuvieron su expresión fenotípica.

En el caso de la proteína vimentina, es necesario saber que es un filamento intermedio del citoesqueleto celular presente en las células derivadas del mesénquima y es utilizada como marcador de células de esta estirpe celular y tejidos conectivos adultos especializados [20]. Se ha demostrado que interviene en la regulación de la expresión fenotípica de los condrocitos [262]. La vimentina es una proteína estructural interviene en procesos celulares como la adhesión y migración, mediante su interacción con las integrinas [163], también posee un rol importante en la regulación de los contactos célula-célula [263] y estudios sugieren que podría intervenir en la regulación de la apoptosis y la respuesta inmunológica [264, 265]. En el estudio de la Vimentina, nuestros resultados positivos mostraron hallazgos comparables a la proteína S100 en ambos grupos experimentales (grupo A y B) durante las cinco semanas de estudio, demostrando que las células mantuvieron su expresión fenotípica, y comprobando su origen mesenquimal.

Anteriormente se explicó que los biomateriales utilizados para Ingeniería Tisular deben permitir la proliferación celular, es importante destacar, que no usamos ningún factor estimulador de proliferación celular en el trabajo experimental desarrollado en la presente Tesis Doctoral. La proliferación celular fue evaluada mediante análisis de PCNA durante las cinco semanas de duración del trabajo experimental.

El PCNA es una proteína descrita como antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), llamado así ya que fue identificado en las células en división [165]. Esta proteína desempeña un rol importante en el metabolismo del ácido nucleico, indispensable para la replicación del ADN y su reparación [165]. El análisis cualitativo y cuantitativo llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, demuestran que los condrocitos proliferaron durante las cinco semanas de tiempo experimental. Aunque disminuyó en la tercera semana para el grupo B y la cuarta semana para el grupo A, probablemente

esta disminución de la proliferación celular en el grupo con mayor número de células (Grupo B) se debió a la inhibición por contacto en las zonas donde se presentaron los grupos celulares. Estos resultados demuestran que los HNFA promueven la proliferación de los condrocitos, manteniendo su fenotipo condrogénico y mesenquimal. Otros estudios realizados, respaldan que en los HFA promueven la proliferación celular, y que las células pueden experimentar variación a lo largo del tiempo [141, 164].

Las células además de proliferar, al parecer podrían migrar en el interior de los hidrogeles. Este proceso de migración conlleva a una remodelación del citoesqueleto generando contactos focales y prolongaciones que le permitan migrar en el tejido [266]. En este sentido, la cortactina es una proteína que regula los componentes necesarios para la protrusión celular [266] como es el caso de los filamentos de actina. En los resultados de nuestros estudios los CHDCE encapsulados en los HNFA, expresaron cortactina en ambos grupos experimentales, lo que sugiere que las células fueron capaces de remodelar su citoesqueleto para adaptarse al biomaterial, establecer interacciones célula-biomaterial y posiblemente migrar entre las fibras de, HNFA. Además, al realizar los análisis de presencia mitocondrial, estos fueron positivos, indicando que las células se mantuvieron activas metabólicamente durante las cinco semanas de estudio en ambos grupos experimentales.

Estos resultados son apoyados por otros estudios llevados a cabo con este biomaterial, en el cual diversos tipos celulares mostraron un incremento en el número de células, signos de interacción célula-biomaterial y expresaron marcadores de actividad metabólica y proliferación celular [113, 141, 142, 247].

Como se ha descrito con anterioridad, MEC del tejido cartilaginoso elástico, es altamente especializada formada por un componente fibrilar como fibras elásticas, colágeno

I y colágeno II y un componente no fibrilar como abundantes GAGs, proteoglicanos biglicano y el complejo de macromoléculas agregano [41, 48, 267, 268].

Las fibras elásticas están compuestas de múltiples microfibrillas que rodean un material amorfo. Este material amorfo es la proteína elastina y las microfibrillas que lo rodean están compuestas por diversas glicoproteínas, incluyendo la fibrillina [11]. En el cartílago elástico son las principales fibras y estas se disponen en forma de red, ubicada en las zonas profundas de la MEC, siendo menos abundantes en la periferia [2].

Los CHDCE encapsulados en los hidrogeles de fibrina-agarosa, fueron capaces de sintetizar diversos componentes de la MEC, destacando las fibras elásticas, fibras de colágeno tipo I y fibras de colágeno tipo II. Estas fibras fueron más abundantes en el grupo B (45000 CHDCE/mL), con mayor contenido de células, y especialmente en las acumulaciones de células que se formaron en el hidrogel. La reacción fue positiva tanto en los grupos experimentales como en el grupo control. En relación a las fibras colágenas, los estudios demuestran que el colágeno tipo II es el principal en la MEC del tejido cartilaginoso [20, 41, 267], actualmente se ha demostrado la presencia de una cantidad considerable de fibras colágenas tipo I en el cartílago elástico nativo, así como en los cultivos de condrocitos derivados de cartílago elástico [41, 76, 77]. Los resultados obtenidos demuestran que los condrocitos han sido capaces de sintetizar, las fibras del componente fibrilar, sin embargo, su expresión y organización no es comparable al tejido nativo, lo cual es coincidente con otros estudios [77, 108, 210, 213, 269]. Además, la expresión y organización de la MEC se ven favorecidos al realizar experimentación *in vivo* [214].

Finalmente, estos resultados, apoyan la hipótesis que los HNFA promueven la función y diferenciación celular *in vitro*, como ha sido demostrado en estudios previos [113, 141-

143, 254], sugiriendo que es un biomaterial adecuado para futuros estudios de diferenciación celular a estirpe condrogénica.

La composición no fibrilar de la MEC del tejido cartilaginoso es muy compleja. Esta comprende distintos GAGs, proteoglicanos y glicoproteínas, distribuidos en la MEC del tejido cartilaginoso. Los proteoglicanos sulfatados y el ácido hialurónico se pueden observar mediante la técnica histoquímica de azul alcian y azul de toluidina (reacción metacromática). Al ser analizados los dos grupos A y B mediante la técnica de azul alcian, se observó una reacción débil en los HNFA a lo largo del tiempo de estudio y la reacción fue mayor en los lugares con mayor densidad celular. Con respecto a la macromolécula de agregano, esta presenta una composición de diversos proteoglicanos unidos a una cadena de ácido hialurónico[267]. El análisis por inmunohistoquímica, demostró que los condrocitos fueron capaces de sintetizar esta molécula *in vitro* pero con un patrón de intensidad no comparable con el cartílago elástico nativo. El agregano es una macromolécula muy importante en la MEC del tejido cartilaginoso, pudiendo ser considerada como un marcador de cartílago [77]. El agregano debido a su alto contenido de proteoglicanos ácidos le proporciona al tejido la hidratación necesaria para la nutrición de sus células y transporte de desechos, además, le proporciona propiedades físico-químicas al tejido [49], e interviene en la interacción célula-célula y célula- MEC [172].

Si bien, el agregano se expresó parcialmente en este estudio, los proteoglicanos versicano y biglicano tuvo una reacción positiva más intensa, en especial en el área pericelular, con una distribución similar a la observada en el colágeno tipo II. El biglicano se encuentra en varios tejidos incluido el cartílago [267] e interviene en el ensamblaje y organización de las fibras colágenas tipo I, II, III [270]. Este proteoglicano

es muy abundante en los tejidos cartilagosos, especialmente en el fibrocartilago [46] por su alto contenido en fibras colágeno tipo I.

El versicano por su parte, se encuentra en mayor concentración durante la condensación mesenquimal durante el desarrollo del tejido cartilaginoso brindando soporte estructural para el agregado y la organización de las fibras colágenas [271]. Al producirse un incremento del versicano en la MEC del tejido en desarrollo, se produce un aumento de la misma, promoviendo la viscoelasticidad de la matriz pericelular, por lo cual, de esta forma interviene en los procesos celulares que contribuyen a la proliferación y migración celular [43, 267, 271]. El versicano está presente en distintos tejidos como el sistema nervioso central, piel, vasos sanguíneos, y tejido cartilaginoso [271]. Si bien, los proteoglicanos biglicano y versicano son moléculas de gran importancia en la fibrillogénesis del colágeno, también promueven diversos procesos celulares como la proliferación y migración celular. Sin embargo, biglicano y versicano no han sido evaluados en la Ingeniería Tisular del cartilago elástico, ni está esclarecido su rol en el tejido nativo.

El análisis global de los proteoglicanos y fibras colágenas evaluadas en los constructos generados en esta Tesis Doctoral, sugieren que versicano y biglicano podrían jugar un rol en la organización de la MEC en los constructos de cartilago elástico generados *in vitro*. Ambos proteoglicanos interactúan con el colágeno, pero además el versicano es una molécula que contribuye a dar soporte a la organización del agregado y de las células [271, 272].

Como resultado final de los estudios que se llevaron a cabo para la realización de la presente Tesis Doctoral, podemos inferir que el biomaterial natural utilizado el hidrogel nanoestructurado compuesto por fibrina-agarosa es adecuado para la encapsulación de los condrocitos humanos derivados de cartilago elástico ya que cumple con las

condiciones requeridas para ser utilizado en la Ingeniería Tisular de cartílago (biocompatible, biodegradable, promover las funciones y diferenciación celular). Sin embargo, es necesario la realización de más estudios para confirmar esta hipótesis, como es el caso de estudios de diferenciación celular con medios específicos de estimulación, que permitirán determinar el grado de diferenciación de los condrocitos y su MEC en los HNFA. Por otro lado, es necesario realizar la caracterización biomecánica de los HNFA con CHDCE generados en esta Tesis Doctoral, con el objetivo de evaluar su potencial aplicación quirúrgica, así como, el impacto de las células en las propiedades físicas y estructurales de los biomateriales a lo largo del tiempo. Finalmente, es importante destacar que el HNFA utilizado en esta Tesis Doctoral, fue aprobado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para su uso clínico, y actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos de córnea y piel artificial. En este sentido, es preciso realizar futuros estudios *in vivo*, que permitirán demostrar la potencial aplicación de estos nuevos sustitutos para que puedan ser transferidos a la clínica.

CONCLUSIONES

1. La metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral ha permitido optimizar el aislamiento y la expansión en un elevado número de condrocitos humanos procedentes de cartílago elástico, sin que se hayan generado alteraciones estructurales y funcionales significativas. Los estudios biofuncionales desarrollados, tras la utilización de dicha metodología, ponen de relieve una alta viabilidad de la población condrocítica y por tanto la idoneidad de la misma para su posible aplicación en los protocolos de ingeniería tisular.
2. La utilización conjunta de la fibrina-agarosa y de la población celular condrocítica aislada y expandida a partir de cartílago elástico, ha permitido, la generación de un constructo cartilaginoso elástico artificial que, tras someterse a un proceso de compresión plástica mediante nanoestructuración, garantiza la existencia de un patrón histológico, homogéneo y estructuralmente estable, compatible con un tejido cartilaginoso elástico ortotípico. Los estudios inmunohistoquímicos realizados en relación con la naturaleza de la estirpe celular, la proliferación y la remodelación morfoestructural de los condrocitos ponen de relieve la progresiva adaptabilidad de dicho linaje celular en relación con el biomaterial, la nanoestructuración y el período cronológico estudiado.
3. El estudio histofuncional realizado mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas sobre la síntesis de moléculas fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular llevado a cabo por la población celular condrocítica utilizada en la generación de constructos, pone de relieve, por un lado la síntesis gradual de moléculas fibrilares (fibras elásticas, fibras colágeno tipo I y II)

características del tejido cartilaginoso elástico y, por otro, de moléculas no fibrilares (agrecano, biglicano y versicano) características, asimismo, de las matrices extracelulares de los tejidos cartilagosos. La existencia de dicho patrón de síntesis en el tejido artificial generado resulta compatible con el tejido cartilaginoso elástico humano, lo que convierte al tejido generado en un posible sustituto terapéutico susceptible de utilización en protocolos de ingeniería tisular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bonucci, E. and P.M. Motta, *Ultrastructure of skeletal tissue : bone and cartilage in health and disease*. Electron microscopy in biology and medicine. 1990, Boston: Kluwer Academic Publishers. x, 299 p.
2. Leeson, T.S., et al., *Texto, atlas de histología*. 1989, México etc.: Interamericana, McGraw-Hill. 741 p.
3. Geneser, F., *Histología*. 2a ed. 1994, Buenos Aires etc.: Editorial Médica Panamericana. 768 p.
4. Poirier, J., I. Cohen, and J.F. Bernaudin, *Histología humana*. 3a ed. 1978, Madrid: Marban. XX, 740 p.
5. Sophia Fox, A.J., A. Bedi, and S.A. Rodeo, *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. Sports Health, 2009. **1**(6): p. 461-8.
6. Langman, J., *Embriología médica*. 7a ed. 1998, Buenos Aires etc.: Médica Panamericana. XII, 424 p.
7. Moore, K.L., T.V.N. Persaud, and M.G. Torchia, *Before we are born : essentials of embryology and birth defects*. 8th ed. 2013, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. xviii, 348 p.
8. DiMarino, A., A. Caplan, and T. Bonfield, *Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair*. Frontiers in Immunology, 2013. **4**(201).
9. Summerbell, D. and L. Wolpert, *Cell density and cell division in the early morphogenesis of the chick wing*. Nat New Biol, 1972. **239**(88): p. 24-6.
10. Janners, M.Y. and R.L. Searls, *Changes in rate of cellular proliferation during the differentiation of cartilage and muscle in the mesenchyme of the embryonic chick wing*. Dev Biol, 1970. **23**(1): p. 136-65.
11. Junqueira, L.C. and J. Carneiro, *Histología básica : texto y atlas*. 12^a® ed. 2015, Buenos Aires ; Madrid etc.: Panamericana. 537 p.
12. Bragdon, B., et al., *Earliest phases of chondrogenesis are dependent upon angiogenesis during ectopic bone formation in mice*. Bone, 2017.
13. Akiyama, H. and V. Lefebvre, *Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis*. J Bone Miner Metab, 2011. **29**(4): p. 390-5.
14. Abedin, M. and N. King, *Diverse evolutionary paths to cell adhesion*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(12): p. 734-42.
15. Michel, G., et al., *The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga Ectocarpus siliculosus. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes*. New Phytol, 2010. **188**(1): p. 82-97.
16. Gao, Y., et al., *The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 648459.
17. Gartner, L.P., et al., *Texto atlas de histología*. 3* ed. 2007, México: McGraw-Hill Interamericana. XI, 574 p.
18. Demoor, M., et al., *Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(8): p. 2414-40.
19. Anders, B.M.a.L., *Tissue engineering of cartilage*. book.
20. Mills, S.E., *Histology for pathologists*. 4th ed ed. 2012, Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins. XXI, 1331 p.
21. Kresse, H. and E. Schonherr, *Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control*. J Cell Physiol, 2001. **189**(3): p. 266-74.
22. Poole, C.A., S. Ayad, and J.R. Schofield, *Chondrons from articular cartilage: I. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons*. J Cell Sci, 1988. **90** (Pt 4): p. 635-43.

23. Guilak, F., et al., *The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1068**: p. 498-512.
24. Chen, C., et al., *Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **305**(12): p. C1202-8.
25. Wilusz, R.E., J. Sanchez-Adams, and F. Guilak, *The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage*. Matrix Biol, 2014. **39**: p. 25-32.
26. Eggli, P.S., et al., *Matrix compartments in the growth plate of the proximal tibia of rats*. Anat Rec, 1985. **211**(3): p. 246-57.
27. Muir, H., *The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. Bioessays, 1995. **17**(12): p. 1039-48.
28. Poole, A.R., et al., *Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair*. Clin Orthop Relat Res, 2001(391 Suppl): p. S26-33.
29. Mow, V.C. and X.E. Guo, *Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies*. Annu Rev Biomed Eng, 2002. **4**: p. 175-209.
30. Ushiki, T., *Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint*. Arch Histol Cytol, 2002. **65**(2): p. 109-26.
31. Kreis, T. and R. Vale, *Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins*. Second edition ed. 1999, Oxford: Oxford University Press. XIX, 568 p.
32. Cremer, M.A., E.F. Rosloniec, and A.H. Kang, *The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(3-4): p. 275-88.
33. Bella, J. and D.J. Hulmes, *Fibrillar Collagens*. Subcell Biochem, 2017. **82**: p. 457-490.
34. Eyre, D., *Collagen of articular cartilage*. Arthritis Res, 2002. **4**(1): p. 30-5.
35. Ushiki, T. and M. Murakumo, *Scanning electron microscopic studies of tissue elastin components exposed by a KOH-collagenase or simple KOH digestion method*. Arch Histol Cytol, 1991. **54**(4): p. 427-36.
36. Kiernan, J.A., *Histological and histochemical methods : theory and practice*. 4th ed. 2008, Oxford: Scion. XVI, 606 p.
37. Ushiki, T., S. Hayashi, and C. Ide, *The filamentous meshwork in the Schwann cell basement membrane as revealed by transmission and scanning electron microscopy*. Arch Histol Cytol, 1990. **53**(5): p. 523-30.
38. Ushiki, T., O. Ohtani, and K. Abe, *Scanning electron microscopic studies of reticular framework in the rat mesenteric lymph node*. Anat Rec, 1995. **241**(1): p. 113-22.
39. Linn, F.C. and L. Sokoloff, *Movement and Composition of Interstitial Fluid of Cartilage*. Arthritis Rheum, 1965. **8**: p. 481-94.
40. Kowitsch, A., G. Zhou, and T. Groth, *Medical Application of Glycosaminoglycans - A Review*. J Tissue Eng Regen Med, 2017.
41. Gentili, C. and R. Cancedda, *Cartilage and bone extracellular matrix*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(12): p. 1334-48.
42. Yanagishita, M., *Function of proteoglycans in the extracellular matrix*. Acta Pathol Jpn, 1993. **43**(6): p. 283-93.
43. Halper, J., *Proteoglycans and diseases of soft tissues*. Adv Exp Med Biol, 2014. **802**: p. 49-58.

44. Yoon, J.H. and J. Halper, *Tendon proteoglycans: biochemistry and function*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2005. **5**(1): p. 22-34.
45. Heinegard, D., *Proteoglycans and more--from molecules to biology*. Int J Exp Pathol, 2009. **90**(6): p. 575-86.
46. Rees, S.G., C.M. Dent, and B. Caterson, *Metabolism of proteoglycans in tendon*. Scand J Med Sci Sports, 2009. **19**(4): p. 470-8.
47. Viola, M., et al., *Fibromodulin interactions with type I and II collagens*. Connect Tissue Res, 2007. **48**(3): p. 141-8.
48. Roughley, P.J., *The structure and function of cartilage proteoglycans*. Eur Cell Mater, 2006. **12**: p. 92-101.
49. Valhmu, W.B., et al., *Load-controlled compression of articular cartilage induces a transient stimulation of aggrecan gene expression*. Arch Biochem Biophys, 1998. **353**(1): p. 29-36.
50. Sivan, S.S., E. Wachtel, and P. Roughley, *Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(10): p. 3181-9.
51. Tabasum, S., et al., *Glycoproteins functionalized natural and synthetic polymers for prospective biomedical applications: A review*. Int J Biol Macromol, 2017.
52. Pfaffle, M., et al., *Anchorin CII, a collagen-binding chondrocyte surface protein of the calpactin family*. Prog Clin Biol Res, 1990. **349**: p. 147-57.
53. Glant, T.T., et al., *Appearance and persistence of fibronectin in cartilage. Specific interaction of fibronectin with collagen type II*. Histochemistry, 1985. **82**(2): p. 149-58.
54. Foldager, C.B., et al., *Distribution of Basement Membrane Molecules, Laminin and Collagen Type IV, in Normal and Degenerated Cartilage Tissues*. Cartilage, 2014. **5**(2): p. 123-32.
55. Brittberg, M. and A. Lindahl, *Chapter 18 - Tissue engineering of cartilage*, in *Tissue Engineering*. 2008, Academic Press: Burlington. p. 533-557.
56. Maroudas, A., M.T. Bayliss, and M.F. Venn, *Further studies on the composition of human femoral head cartilage*. Ann Rheum Dis, 1980. **39**(5): p. 514-23.
57. Heinegard, D. and A. Oldberg, *Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules*. FASEB J, 1989. **3**(9): p. 2042-51.
58. Athanasiou, K.A., et al., *Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage*. J Orthop Res, 1991. **9**(3): p. 330-40.
59. Chan, D.D., C.P. Neu, and M.L. Hull, *In situ deformation of cartilage in cyclically loaded tibiofemoral joints by displacement-encoded MRI*. Osteoarthritis Cartilage, 2009. **17**(11): p. 1461-8.
60. Kaab, M.J., et al., *Deformation of articular cartilage collagen structure under static and cyclic loading*. J Orthop Res, 1998. **16**(6): p. 743-51.
61. Gaut, C. and K. Sugaya, *Critical review on the physical and mechanical factors involved in tissue engineering of cartilage*. Regen Med, 2015. **10**(5): p. 665-79.
62. Swann, D.A., et al., *The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids*. Biochem J, 1985. **225**(1): p. 195-201.
63. ap Gwynn, I., et al., *Novel aspects to the structure of rabbit articular cartilage*. Eur Cell Mater, 2002. **4**: p. 18-29.
64. Ateshian, G.A., et al., *Finite deformation biphasic material properties of bovine articular cartilage from confined compression experiments*. J Biomech, 1997. **30**(11-12): p. 1157-64.

65. Mow, V.C., M.H. Holmes, and W.M. Lai, *Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review*. J Biomech, 1984. **17**(5): p. 377-94.
66. Palastanga, N., D. Field, and R. Soames, *Anatomía y movimiento humano : estructura y funcionamiento*. 1a ed. 2007, Badalona: Paidotribio. 606 p.
67. Makris, E.A., P. Hadidi, and K.A. Athanasiou, *The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration*. Biomaterials, 2011. **32**(30): p. 7411-31.
68. Almarza, A.J. and K.A. Athanasiou, *Evaluation of three growth factors in combinations of two for temporomandibular joint disc tissue engineering*. Arch Oral Biol, 2006. **51**(3): p. 215-21.
69. Gómez de Ferraris, M.E. and A. Campos Muñoz, *Histología y embriología bucodental*. 3* ed. 2009, Buenos Aires ; Madrid: Panamericana. 454 p.
70. Landesberg, R., E. Takeuchi, and J.E. Puzas, *Cellular, biochemical and molecular characterization of the bovine temporomandibular joint disc*. Arch Oral Biol, 1996. **41**(8-9): p. 761-7.
71. Berkovitz, B.K. and J. Pacy, *Age changes in the cells of the intra-articular disc of the temporomandibular joints of rats and marmosets*. Arch Oral Biol, 2000. **45**(11): p. 987-95.
72. Detamore, M.S., et al., *Cell type and distribution in the porcine temporomandibular joint disc*. J Oral Maxillofac Surg, 2006. **64**(2): p. 243-8.
73. Mizoguchi, I., et al., *An immunohistochemical study of the localization of biglycan, decorin and large chondroitin-sulphate proteoglycan in adult rat temporomandibular joint disc*. Arch Oral Biol, 1998. **43**(11): p. 889-98.
74. Haus, B.M., A.N. Mastrangelo, and M.M. Murray, *Effect of anterior cruciate healing on the uninjured ligament insertion site*. J Orthop Res, 2012. **30**(1): p. 86-94.
75. Wu, J.Z. and W. Herzog, *Elastic anisotropy of articular cartilage is associated with the microstructures of collagen fibers and chondrocytes*. J Biomech, 2002. **35**(7): p. 931-42.
76. Pappa, A.K., et al., *Biochemical properties of tissue-engineered cartilage*. J Craniofac Surg, 2014. **25**(1): p. 111-5.
77. Yanaga, H., et al., *Cell-engineered human elastic chondrocytes regenerate natural scaffold in vitro and neocartilage with neoperichondrium in the human body post-transplantation*. Tissue Eng Part A, 2012. **18**(19-20): p. 2020-9.
78. Mansfield, J., et al., *The elastin network: its relationship with collagen and cells in articular cartilage as visualized by multiphoton microscopy*. J Anat, 2009. **215**(6): p. 682-91.
79. Green, E.M., et al., *The structure and micromechanics of elastic tissue*. Interface Focus, 2014. **4**(2): p. 20130058.
80. Bhattacharjee, M., et al., *Tissue engineering strategies to study cartilage development, degeneration and regeneration*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **84**: p. 107-22.
81. Robbins, S.L., R.S. Cotran, and V. Kumar, *Patología estructural y funcional : manual de Robbins*. 5* ed. 1997, México ; Madrid etc.: McGraw-Hill.Interamericana. XII, 669 p.
82. Nuara, M.J., R.B. Loch, and S.A. Saxon, *Reconstructive Rhinoplasty Using Multiplanar Carved Costal Cartilage*. JAMA Facial Plast Surg, 2016. **18**(3): p. 207-11.
83. Camp, C.L., M.J. Stuart, and A.J. Krych, *Current concepts of articular cartilage restoration techniques in the knee*. Sports Health, 2014. **6**(3): p. 265-73.

84. Mlynarek, R.A., A.W. Kuhn, and A. Bedi, *Platelet-Rich Plasma (PRP) in Orthopedic Sports Medicine*. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2016. **45**(5): p. 290-326.
85. Whitehouse, M.R., et al., *Repair of Torn Avascular Meniscal Cartilage Using Undifferentiated Autologous Mesenchymal Stem Cells: From In Vitro Optimization to a First-in-Human Study*. Stem Cells Transl Med, 2017. **6**(4): p. 1237-1248.
86. Cui, G.H., et al., *Efficacy of mesenchymal stem cells in treating patients with osteoarthritis of the knee: A meta-analysis*. Exp Ther Med, 2016. **12**(5): p. 3390-3400.
87. Gudas, R., et al., *Comparison of osteochondral autologous transplantation, microfracture, or debridement techniques in articular cartilage lesions associated with anterior cruciate ligament injury: a prospective study with a 3-year follow-up*. Arthroscopy, 2013. **29**(1): p. 89-97.
88. Makris, E.A., et al., *Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(1): p. 21-34.
89. El Bitar, Y.F., et al., *Joint-preserving surgical options for management of chondral injuries of the hip*. J Am Acad Orthop Surg, 2014. **22**(1): p. 46-56.
90. Magnussen, R.A., et al., *Treatment of focal articular cartilage defects in the knee: a systematic review*. Clin Orthop Relat Res, 2008. **466**(4): p. 952-62.
91. Lyon, R. and X.C. Liu, *Future treatment strategies for cartilage repair*. Clin Sports Med, 2014. **33**(2): p. 335-52.
92. Dunkin, B.S. and C. Lattermann, *New and Emerging Techniques in Cartilage Repair: MACI*. Oper Tech Sports Med, 2013. **21**(2): p. 100-107.
93. Behrens, P., et al., *Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up*. Knee, 2006. **13**(3): p. 194-202.
94. Zopf, D.A., et al., *Biomechanical evaluation of human and porcine auricular cartilage*. Laryngoscope, 2015. **125**(8): p. E262-8.
95. Tardy, M.E., Jr., J. Denny, 3rd, and M.H. Fritsch, *The versatile cartilage autograft in reconstruction of the nose and face*. Laryngoscope, 1985. **95**(5): p. 523-33.
96. Cummings, C.W. and P.W. Flint, *Cummings Otolaryngology head and neck surgery*. 2010, Philadelphia: Mosby.
97. Kuo, C.Y., et al., *Incorporation of chitosan in biomimetic gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan cryogel for cartilage tissue engineering*. Carbohydr Polym, 2015. **117**: p. 722-30.
98. Hsiao, H.T., Y.S. Leu, and K.Y. Tung, *Epiglottis reconstruction with free radial forearm flap after supraglottic laryngectomy*. Am J Otolaryngol, 2010. **31**(2): p. 132-5.
99. Luquetti, D.V., et al., *Microtia: epidemiology and genetics*. Am J Med Genet A, 2012. **158A**(1): p. 124-39.
100. Wilkes, G.H., J. Wong, and R. Guilfoyle, *Microtia reconstruction*. Plast Reconstr Surg, 2014. **134**(3): p. 464e-479e.
101. Brent, B., *The pediatrician's role in caring for patients with congenital microtia and atresia*. Pediatr Ann, 1999. **28**(6): p. 374-83.
102. Kelley, P.E. and M.A. Scholes, *Microtia and congenital aural atresia*. Otolaryngol Clin North Am, 2007. **40**(1): p. 61-80, vi.

103. Ohara, K., K. Nakamura, and E. Ohta, *Chest wall deformities and thoracic scoliosis after costal cartilage graft harvesting*. *Plast Reconstr Surg*, 1997. **99**(4): p. 1030-6.
104. Tanzer, R.C., *Microtia--a long-term follow-up of 44 reconstructed auricles*. *Plast Reconstr Surg*, 1978. **61**(2): p. 161-6.
105. Brent, B., *Technical advances in ear reconstruction with autogenous rib cartilage grafts: personal experience with 1200 cases*. *Plast Reconstr Surg*, 1999. **104**(2): p. 319-34; discussion 335-8.
106. Han, K. and D. Son, *Osseointegrated alloplastic ear reconstruction with the implant-carrying plate system in children*. *Plast Reconstr Surg*, 2002. **109**(2): p. 496-503; discussion 504-5.
107. Romo, T., 3rd, P.M. Presti, and H.R. Yalamanchili, *Medpor alternative for microtia repair*. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 2006. **14**(2): p. 129-36, vi.
108. Dahl, J.P., et al., *Analysis of human auricular cartilage to guide tissue-engineered nanofiber-based chondrogenesis: implications for microtia reconstruction*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2011. **145**(6): p. 915-23.
109. Vacanti, C.A., *The history of tissue engineering*. *J Cell Mol Med*, 2006. **10**(3): p. 569-76.
110. Bock, G. and J. Goode, *Tissue engineering of cartilage and bone*. Novartis Foundation symposium. 2003, Chichester (United Kindom): John Wiley & Sons. IX, 251 p.
111. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. *Science*, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
112. *Tissue engineering. Selected papers from the UCLA Symposium of Tissue Engineering. Keystone, Colorado, April 6-12, 1990*. *J Biomech Eng*, 1991. **113**(2): p. 111-207.
113. Carriel, V., et al., *Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials*. *Cells Tissues Organs*, 2012. **196**(1): p. 1-12.
114. Carriel, V., et al., *Tissue engineering of the peripheral nervous system*. *Expert Rev Neurother*, 2014. **14**(3): p. 301-18.
115. Silva, J.M., et al., *Nanostructured 3D constructs based on chitosan and chondroitin sulphate multilayers for cartilage tissue engineering*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e55451.
116. Nayyer, L., et al., *Tissue engineering: revolution and challenge in auricular cartilage reconstruction*. *Plast Reconstr Surg*, 2012. **129**(5): p. 1123-37.
117. Oliveira, J.T. and R.L. Reis, *Polysaccharide-based materials for cartilage tissue engineering applications*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011. **5**(6): p. 421-36.
118. Tsai, M.C., et al., *Evaluation of biodegradable elastic scaffolds made of anionic polyurethane for cartilage tissue engineering*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015. **125**: p. 34-44.
119. Bhardwaj, N., D. Devi, and B.B. Mandal, *Tissue-engineered cartilage: the crossroads of biomaterials, cells and stimulating factors*. *Macromol Biosci*, 2015. **15**(2): p. 153-82.
120. Lee, E.H. and J.H. Hui, *The potential of stem cells in orthopaedic surgery*. *J Bone Joint Surg Br*, 2006. **88**(7): p. 841-51.
121. Oda, T., et al., *Osteoarthritis-derived chondrocytes are a potential source of multipotent progenitor cells for cartilage tissue engineering*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016.

122. Kreuz, P.C., et al., *Scaffold-assisted cartilage tissue engineering using infant chondrocytes from human hip cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2013. **21**(12): p. 1997-2005.
123. Jurgens, W.J., et al., *Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Cell Tissue Res, 2008. **332**(3): p. 415-26.
124. Sakaguchi, Y., et al., *Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(8): p. 2521-9.
125. Hwang, N.S., et al., *In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20641-6.
126. Freed, L.E., et al., *Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(7): p. 689-93.
127. Dhollander, A.A., et al., *The use of scaffolds in the treatment of osteochondral lesions in the knee: current concepts and future trends*. J Knee Surg, 2012. **25**(3): p. 179-86.
128. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(1): p. 3-12.
129. Bryant, S.J., et al., *Synthesis and characterization of photopolymerized multifunctional hydrogels: Water-soluble poly(vinyl alcohol) and chondroitin sulfate macromers for chondrocyte encapsulation*. Macromolecules, 2004. **37**(18): p. 6726-6733.
130. Muhonen, V., et al., *Articular cartilage repair with recombinant human type II collagen/polylactide scaffold in a preliminary porcine study*. J Orthop Res, 2016. **34**(5): p. 745-53.
131. Zignego, D.L., et al., *The mechanical microenvironment of high concentration agarose for applying deformation to primary chondrocytes*. J Biomech, 2014. **47**(9): p. 2143-8.
132. Levett, P.A., et al., *Hyaluronic acid enhances the mechanical properties of tissue-engineered cartilage constructs*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e113216.
133. Kim, I.L., R.L. Mauck, and J.A. Burdick, *Hydrogel design for cartilage tissue engineering: a case study with hyaluronic acid*. Biomaterials, 2011. **32**(34): p. 8771-82.
134. Ahearne, M. and D.J. Kelly, *A comparison of fibrin, agarose and gellan gum hydrogels as carriers of stem cells and growth factor delivery microspheres for cartilage regeneration*. Biomed Mater, 2013. **8**(3): p. 035004.
135. Salkeld, S.L., et al., *Biological and functional evaluation of a novel pyrolytic carbon implant for the treatment of focal osteochondral defects in the medial femoral condyle: assessment in a canine model*. J Orthop Surg Res, 2016. **11**(1): p. 155.
136. Iwasaki, N., *Development of cartilage tissue engineering techniques based on biomedical research*. J Orthop Sci, 2014. **19**(5): p. 699-706.
137. Di Bella, C., et al., *3D Bioprinting of Cartilage for Orthopedic Surgeons: Reading between the Lines*. Front Surg, 2015. **2**: p. 39.
138. Liao, J., et al., *Bioactive polymer/extracellular matrix scaffolds fabricated with a flow perfusion bioreactor for cartilage tissue engineering*. Biomaterials, 2010. **31**(34): p. 8911-20.
139. Mironov, V., et al., *Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm*. Biofabrication, 2009. **1**(2): p. 022001.

140. Alaminos, M., et al., *Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(8): p. 3311-7.
141. Carriel, V., et al., *In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute*. J Tissue Eng Regen Med, 2015.
142. San Martin, S., et al., *The effects of fibrin and fibrin-agarose on the extracellular matrix profile of bioengineered oral mucosa*. J Tissue Eng Regen Med, 2013. **7**(1): p. 10-9.
143. Garzon, I., et al., *Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(7): p. 4073-83.
144. Scionti, G., et al., *Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model*. J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(8): p. 2573-82.
145. Garcia-Martinez, L., et al., *Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels*. Histochem Cell Biol, 2016.
146. Rosa, R.G., et al., *Growth factor stimulation improves the structure and properties of scaffold-free engineered auricular cartilage constructs*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e105170.
147. Goldring, M.B., *Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2006. **20**(5): p. 1003-25.
148. Facchini, A., et al., *Human chondrocytes and mesenchymal stem cells grown onto engineered scaffold*. Biorheology, 2006. **43**(3-4): p. 471-80.
149. Sekiya, I., et al., *Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma*. Cell Tissue Res, 2005. **320**(2): p. 269-76.
150. Chia, S.L., et al., *Fibroblast growth factor 2 is an intrinsic chondroprotective agent that suppresses ADAMTS-5 and delays cartilage degradation in murine osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(7): p. 2019-27.
151. Miot, S., et al., *Cartilage tissue engineering by expanded goat articular chondrocytes*. J Orthop Res, 2006. **24**(5): p. 1078-85.
152. Davidson, D., et al., *Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20509-15.
153. Yoon, D.M. and J.P. Fisher, *Effects of exogenous IGF-1 delivery on the early expression of IGF-1 signaling molecules by alginate embedded chondrocytes*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(7): p. 1263-73.
154. Cucchiari, M. and H. Madry, *Overexpression of human IGF-1 via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects in vivo*. Gene Ther, 2014. **21**(9): p. 811-9.
155. Elder, B.D. and K.A. Athanasiou, *Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: from chondrocytes to tissue regeneration*. Tissue Eng Part B Rev, 2009. **15**(1): p. 43-53.
156. Garzon, I., et al., *A combined approach for the assessment of cell viability and cell functionality of human fibrochondrocytes for use in tissue engineering*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51961.
157. Martin-Piedra, M.A., et al., *Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures*. Cytotherapy, 2014. **16**(2): p. 266-77.

158. Donato, R., *Intracellular and extracellular roles of S100 proteins*. Microsc Res Tech, 2003. **60**(6): p. 540-51.
159. Stefansson, K., et al., *S-100 protein in human chondrocytes*. Nature, 1982. **295**(5844): p. 63-4.
160. Chano, T., et al., *The identity of proliferating cells in bone tumors with cartilaginous components: evaluation by double-immunohistochemical staining using proliferating cell nuclear antigen and S-100 protein*. Eur J Histochem, 1995. **39**(1): p. 21-30.
161. Nakamura, Y., L.E. Becker, and A. Marks, *S100 protein in human chordoma and human and rabbit notochord*. Arch Pathol Lab Med, 1983. **107**(3): p. 118-20.
162. Yammani, R.R., *S100 proteins in cartilage: role in arthritis*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(4): p. 600-6.
163. Ivaska, J., et al., *Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling*. Exp Cell Res, 2007. **313**(10): p. 2050-62.
164. Rodriguez, M.A., et al., *Cryopreservation of an artificial human oral mucosa stroma. A viability and rheological study*. Cryobiology, 2013. **67**(3): p. 355-62.
165. Kelman, Z., *PCNA: structure, functions and interactions*. Oncogene, 1997. **14**(6): p. 629-40.
166. Cosen-Binker, L.I. and A. Kapus, *Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 352-61.
167. Kirkbride, K.C., et al., *Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness*. Cell Adh Migr, 2011. **5**(2): p. 187-98.
168. Bowden, E.T., et al., *An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation*. Oncogene, 1999. **18**(31): p. 4440-9.
169. Wu, H., et al., *Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(10): p. 5113-24.
170. Clark, E.S. and A.M. Weaver, *A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion*. Eur J Cell Biol, 2008. **87**(8-9): p. 581-90.
171. Martinez-Outschoorn, U.E., et al., *Ketone bodies and two-compartment tumor metabolism: stromal ketone production fuels mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells*. Cell Cycle, 2012. **11**(21): p. 3956-63.
172. Kiani, C., et al., *Structure and function of aggrecan*. Cell Res, 2002. **12**(1): p. 19-32.
173. Nastase, M.V., M.F. Young, and L. Schaefer, *Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals*. J Histochem Cytochem, 2012. **60**(12): p. 963-75.
174. Bode-Lesniewska, B., et al., *Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues*. J Histochem Cytochem, 1996. **44**(4): p. 303-12.
175. Yamagata, M., et al., *Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts. Implications for their roles in cell-substratum adhesion*. J Cell Sci, 1993. **106** (Pt 1): p. 55-65.
176. Landolt, R.M., et al., *Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth*. Development, 1995. **121**(8): p. 2303-12.
177. Kishimoto, J., et al., *Selective activation of the versican promoter by epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7336-41.

178. Charras, G. and E. Sahai, *Physical influences of the extracellular environment on cell migration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(12): p. 813-24.
179. Barbero, A., et al., *Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. **12**(6): p. 476-84.
180. Hayes, A.J., et al., *Macromolecular organization and in vitro growth characteristics of scaffold-free neocartilage grafts*. J Histochem Cytochem, 2007. **55**(8): p. 853-66.
181. Kessler, M.W. and D.A. Grande, *Tissue engineering and cartilage*. Organogenesis, 2008. **4**(1): p. 28-32.
182. Hu, R., et al., *Laryngeal chondrosarcoma of the arytenoid cartilage presenting as bilateral vocal fold immobility: a case report and literature review*. J Voice, 2014. **28**(1): p. 129 e13-129 e17.
183. Potochny, E.M. and A.R. Huber, *Laryngeal chondrosarcoma*. Head Neck Pathol, 2014. **8**(1): p. 114-6.
184. Coca-Pelaz, A., et al., *Chondrosarcomas of the head and neck*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2014. **271**(10): p. 2601-9.
185. O'Connell, L., et al., *Synovial chondroma in Hoffa's fat pad: Case report and literature review of a rare disorder*. Int J Surg Case Rep, 2017.
186. Tang, C., et al., *Current management of hand enchondroma: a review*. Hand Surg, 2015. **20**(1): p. 191-5.
187. Qasem, S.A. and B.R. DeYoung, *Cartilage-forming tumors*. Semin Diagn Pathol, 2014. **31**(1): p. 10-20.
188. Pap, T. and A. Korb-Pap, *Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis--two unequal siblings*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(10): p. 606-15.
189. Kumar, V., et al., *Destructive post-traumatic chondrolysis of the subtalar joint: a case report and review of the literature*. BMJ Case Rep, 2013. **2013**.
190. Smolen, J.S., D. Aletaha, and I.B. McInnes, *Rheumatoid arthritis*. Lancet, 2016. **388**(10055): p. 2023-2038.
191. Bartel-Friedrich, S., *Congenital Auricular Malformations: Description of Anomalies and Syndromes*. Facial Plast Surg, 2015. **31**(6): p. 567-80.
192. Gillogly, S.D. and K.S. Wheeler, *Autologous Chondrocyte Implantation With Collagen Membrane*. Sports Med Arthrosc, 2015. **23**(3): p. 118-24.
193. Basad, E., et al., *Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) in the knee: clinical outcomes and challenges*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2015. **23**(12): p. 3729-35.
194. Phull, A.R., et al., *Applications of Chondrocyte-Based Cartilage Engineering: An Overview*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 1879837.
195. Isogai, N., et al., *Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures*. Tissue Eng, 2006. **12**(4): p. 691-703.
196. Zeng, L., et al., *Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes in a novel three-dimensional microcavitary hydrogel*. J Biomed Mater Res A, 2015. **103**(5): p. 1693-702.
197. Fellows, C.R., et al., *Adipose, Bone Marrow and Synovial Joint-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair*. Front Genet, 2016. **7**: p. 213.
198. Rohban, R. and T.R. Pieber, *Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential*. Stem Cells Int, 2017. **2017**: p. 5173732.
199. Hendijani, F., *Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues*. Cell Prolif, 2017.

200. Nuti, N., et al., *Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review*. Stem Cell Rev, 2016. **12**(5): p. 511-523.
201. Coleman, R.M., N.D. Case, and R.E. Guldberg, *Hydrogel effects on bone marrow stromal cell response to chondrogenic growth factors*. Biomaterials, 2007. **28**(12): p. 2077-86.
202. Banfi, A., et al., *Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy*. Exp Hematol, 2000. **28**(6): p. 707-15.
203. Mauck, R.L., X. Yuan, and R.S. Tuan, *Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(2): p. 179-89.
204. Estes, B.T., B.O. Diekman, and F. Guilak, *Monolayer cell expansion conditions affect the chondrogenic potential of adipose-derived stem cells*. Biotechnol Bioeng, 2008. **99**(4): p. 986-95.
205. Afizah, H., et al., *A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors*. Tissue Eng, 2007. **13**(4): p. 659-66.
206. Nazempour, A. and B.J. Van Wie, *Chondrocytes, Mesenchymal Stem Cells, and Their Combination in Articular Cartilage Regenerative Medicine*. Ann Biomed Eng, 2016. **44**(5): p. 1325-54.
207. Gugjoo, M.B., et al., *Cartilage tissue engineering: Role of mesenchymal stem cells along with growth factors & scaffolds*. Indian J Med Res, 2016. **144**(3): p. 339-347.
208. Goldberg, A., et al., *The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review*. J Orthop Surg Res, 2017. **12**(1): p. 39.
209. Goh, B.S., et al., *Chondrogenesis of human adipose derived stem cells for future microtia repair using co-culture technique*. Acta Otolaryngol, 2017. **137**(4): p. 432-441.
210. Mahmoudifar, N. and P.M. Doran, *Chondrogenesis and cartilage tissue engineering: the longer road to technology development*. Trends Biotechnol, 2012. **30**(3): p. 166-76.
211. Jeon, J.E., et al., *Dynamic compression improves biosynthesis of human zonal chondrocytes from osteoarthritis patients*. Osteoarthritis Cartilage, 2012. **20**(8): p. 906-15.
212. Levett, P.A., et al., *A biomimetic extracellular matrix for cartilage tissue engineering centered on photocurable gelatin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate*. Acta Biomater, 2014. **10**(1): p. 214-23.
213. Zhao, X., et al., *Conditions for seeding and promoting neo-auricular cartilage formation in a fibrous collagen scaffold*. J Craniomaxillofac Surg, 2015. **43**(3): p. 382-9.
214. Ishak, M.F., et al., *The formation of human auricular cartilage from microtic tissue: An in vivo study*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2015. **79**(10): p. 1634-9.
215. Zhou, L., et al., *Cartilage engineering using chondrocyte cell sheets and its application in reconstruction of microtia*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(1): p. 73-80.
216. Nam, S., et al., *Xiphoid process-derived chondrocytes: a novel cell source for elastic cartilage regeneration*. Stem Cells Transl Med, 2014. **3**(11): p. 1381-91.
217. Li, S., et al., *The effect of oxygen tension on human articular chondrocyte matrix synthesis: integration of experimental and computational approaches*. Biotechnol Bioeng, 2014. **111**(9): p. 1876-85.

218. Horak, M., et al., *Comparison of the cellular composition of two different chondrocyte-seeded biomaterials and the results of their transplantation in humans*. Folia Biol (Praha), 2014. **60**(1): p. 1-9.
219. Berneel, E., et al., *Redifferentiation of High-Throughput Generated Fibrochondrocyte Micro-Aggregates: Impact of Low Oxygen Tension*. Cells Tissues Organs, 2016. **202**(5-6): p. 369-381.
220. Garcia-Lopez, J., et al., *Chondrocyte differentiation for auricular cartilage reconstruction using a chitosan based hydrogel*. Histol Histopathol, 2015. **30**(12): p. 1477-85.
221. Huang, B.J., J.C. Hu, and K.A. Athanasiou, *Effects of passage number and post-expansion aggregate culture on tissue engineered, self-assembled neocartilage*. Acta Biomater, 2016. **43**: p. 150-9.
222. Stoddart, M.J., et al., *Cells and biomaterials in cartilage tissue engineering*. Regen Med, 2009. **4**(1): p. 81-98.
223. Muller, F.A., et al., *Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering*. Biomaterials, 2006. **27**(21): p. 3955-63.
224. Mallick, S.P., et al., *Strategies on process engineering of chondrocyte culture for cartilage tissue regeneration*. Bioprocess Biosyst Eng, 2016.
225. Zhao, M., et al., *Repair of articular cartilage defects in rabbits through tissue-engineered cartilage constructed with chitosan hydrogel and chondrocytes*. J Zhejiang Univ Sci B, 2015. **16**(11): p. 914-23.
226. Haaparanta, A.M., et al., *Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med, 2014. **25**(4): p. 1129-36.
227. Deponti, D., et al., *Collagen scaffold for cartilage tissue engineering: the benefit of fibrin glue and the proper culture time in an infant cartilage model*. Tissue Eng Part A, 2014. **20**(5-6): p. 1113-26.
228. Chung, C., et al., *Differential behavior of auricular and articular chondrocytes in hyaluronic acid hydrogels*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(7): p. 1121-31.
229. Klein, T.J., et al., *Strategies for zonal cartilage repair using hydrogels*. Macromol Biosci, 2009. **9**(11): p. 1049-58.
230. Mouw, J.K., et al., *Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(9): p. 828-36.
231. Park, K.M., et al., *Thermosensitive chitosan-Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration*. Acta Biomater, 2009. **5**(6): p. 1956-65.
232. Lee, H. and T.G. Park, *Photo-crosslinkable, biomimetic, and thermo-sensitive pluronic grafted hyaluronic acid copolymers for injectable delivery of chondrocytes*. J Biomed Mater Res A, 2009. **88**(3): p. 797-806.
233. Deponti, D., et al., *Fibrin-based model for cartilage regeneration: tissue maturation from in vitro to in vivo*. Tissue Eng Part A, 2012. **18**(11-12): p. 1109-22.
234. Scotti, C., et al., *Effect of in vitro culture on a chondrocyte-fibrin glue hydrogel for cartilage repair*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2010. **18**(10): p. 1400-6.
235. Wang, Y., et al., *Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes*. Biomaterials, 2006. **27**(25): p. 4434-42.

236. Wang, Y., et al., *In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells*. *Biomaterials*, 2005. **26**(34): p. 7082-94.
237. Galois, L., et al., *Bovine chondrocyte behaviour in three-dimensional type I collagen gel in terms of gel contraction, proliferation and gene expression*. *Biomaterials*, 2006. **27**(1): p. 79-90.
238. Eyrich, D., et al., *Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering*. *Biomaterials*, 2007. **28**(1): p. 55-65.
239. Ahmed, T.A., E.V. Dare, and M. Hincke, *Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2008. **14**(2): p. 199-215.
240. Froelich, K., et al., *Influence of different growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells in polyurethane-fibrin composites*. *Int J Artif Organs*, 2012. **35**(12): p. 1047-60.
241. Kusuvara, H., et al., *Tissue engineering a model for the human ear: assessment of size, shape, morphology, and gene expression following seeding of different chondrocytes*. *Wound Repair Regen*, 2009. **17**(1): p. 136-46.
242. Liu, Y., et al., *In vitro engineering of human ear-shaped cartilage assisted with CAD/CAM technology*. *Biomaterials*, 2010. **31**(8): p. 2176-83.
243. Nestic, D., et al., *Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006. **58**(2): p. 300-22.
244. Athanasiou, K.A., et al., *Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers*. *Arthroscopy*, 1998. **14**(7): p. 726-37.
245. Schlosshauer, B., et al., *Synthetic nerve guide implants in humans: a comprehensive survey*. *Neurosurgery*, 2006. **59**(4): p. 740-7; discussion 747-8.
246. Bryant, S.J., K.L. Durand, and K.S. Anseth, *Manipulations in hydrogel chemistry control photoencapsulated chondrocyte behavior and their extracellular matrix production*. *J Biomed Mater Res A*, 2003. **67**(4): p. 1430-6.
247. Carriel, V., et al., *Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration*. *J Neural Eng*, 2013. **10**(2): p. 026022.
248. Sanchez-Quevedo, M.C., et al., *Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering*. *Histol Histopathol*, 2007. **22**(6): p. 631-40.
249. Garzon, I., et al., *Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration*. *Stem Cells Transl Med*, 2013. **2**(8): p. 625-32.
250. Oliveira, A.C., et al., *Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering*. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e66538.
251. Jaimes-Parra, B.D., et al., *Ex vivo construction of a novel model of bioengineered bladder mucosa: A preliminary study*. *Int J Urol*, 2016. **23**(1): p. 85-92.
252. Nieto-Aguilar, R., et al., *Pluripotential differentiation capability of human adipose-derived stem cells in a novel fibrin-agarose scaffold*. *J Biomater Appl*, 2011. **25**(7): p. 743-68.
253. Fernandez-Valades-Gamez, R., et al., *Usefulness of a bioengineered oral mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiosteal defect*. *Biomed Mater*, 2016. **11**(1): p. 015015.
254. Ionescu, A.M., et al., *Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties*. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2011. **4**(8): p. 1963-73.

255. Rodriguez-Arco, L., et al., *Biocompatible magnetic core-shell nanocomposites for engineered magnetic tissues*. *Nanoscale*, 2016. **8**(15): p. 8138-50.
256. <Brown_et_al-2005-Advanced_Functional_Materials.pdf>.
257. Campos, F., et al., *Ex vivo characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose hydrogel for tissue engineering applications*. *Biomed Mater*, 2016. **11**(5): p. 055004.
258. Chung, C. and J.A. Burdick, *Engineering cartilage tissue*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. **60**(2): p. 243-62.
259. Bobick, B.E., et al., *Regulation of the chondrogenic phenotype in culture*. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2009. **87**(4): p. 351-71.
260. Johnstone, B., et al., *Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art*. *Eur Cell Mater*, 2013. **25**: p. 248-67.
261. Diaz-Romero, J., et al., *S100A1 and S100B expression patterns identify differentiation status of human articular chondrocytes*. *J Cell Physiol*, 2014. **229**(8): p. 1106-17.
262. Chen, C., et al., *Effects of vimentin disruption on the mechanoresponses of articular chondrocyte*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. **469**(1): p. 132-7.
263. Green, K.J., et al., *Intermediate filament associated proteins*. *Adv Protein Chem*, 2005. **70**: p. 143-202.
264. Yang, X., et al., *Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. *Am J Pathol*, 2005. **167**(3): p. 705-19.
265. Bhattacharya, B., R.J. Noad, and P. Roy, *Interaction between Bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress*. *Virology*, 2007. **4**: p. 7.
266. Ren, G., M.S. Crampton, and A.S. Yap, *Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2009. **66**(10): p. 865-73.
267. Kreis, T. and R. Vale, *Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins*. 2nd ed. 1999, Oxford: A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press. xx, 551 p.
268. Griffin, M.F., et al., *Biomechanical Characterisation of the Human Auricular Cartilages; Implications for Tissue Engineering*. *Ann Biomed Eng*, 2016.
269. Dunkelman, N.S., et al., *Cartilage production by rabbit articular chondrocytes on polyglycolic acid scaffolds in a closed bioreactor system*. *Biotechnol Bioeng*, 1995. **46**(4): p. 299-305.
270. Giachini, F.R., et al., *Maternal diabetes affects specific extracellular matrix components during placentation*. *J Anat*, 2008. **212**(1): p. 31-41.
271. Matsumoto, K., et al., *Identification and characterization of versican/PG-M aggregates in cartilage*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(26): p. 18257-63.
272. Shibata, S., et al., *In situ hybridization and immunohistochemistry of versican, aggrecan and link protein, and histochemistry of hyaluronan in the developing mouse limb bud cartilage*. *J Anat*, 2003. **203**(4): p. 425-32.