



Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO: Ciencias de la Salud

**UN ABORDAJE DE LA RECONSTRUCCIÓN
AURICULAR DESDE LA INGENIERÍA TISULAR
A TISSUE-ENGINEERED APPROACH TO AURICULAR
RECONSTRUCTION**

David Robla Costales



Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO: Ciencias de la Salud

**UN ABORDAJE DE LA RECONSTRUCCIÓN
AURICULAR DESDE LA INGENIERÍA TISULAR
A TISSUE-ENGINEERED APPROACH TO AURICULAR
RECONSTRUCTION**

David Robla Costales



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Un abordaje de la reconstrucción auricular desde la Ingeniería Tisular	Inglés: A tissue-engineered approach to auricular reconstruction
2.- Autor	
Nombre: David Robla Costales	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Reconstrucción maxilofacial mediante técnicas de ingeniería tisular y microcirugía	
Órgano responsable: Departamento de Medicina	

RESUMEN (en español)

Introducción:

La reconstrucción de defectos auriculares, ya sean congénitos o adquiridos, supone un reto para la cirugía reconstructiva. Los métodos disponibles actualmente se resumen en reconstrucciones mediante cartilago autólogo, materiales sintéticos o prótesis externas. De ellos, la reconstrucción mediante cartilago costal constituye el gold standard actual. Sin embargo, no está exento de riesgos y complicaciones, entre los que están la extrusión del implante, la deformidad y el dolor residual de la zona donante, y la perforación pleural.

Para superar las limitaciones de tejido donante (cartilago autólogo) y reducir la morbilidad asociada con su obtención, los métodos de Ingeniería Tisular se postulan como una opción reconstructiva atractiva. Mediante este trabajo se pretende valorar la utilidad de un nuevo soporte desarrollado por el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos a partir de proteínas plasmáticas en estrategias de Ingeniería Tisular de cartilago para su posterior aplicación clínica en reconstrucción de defectos auriculares.

Objetivos:

1. Medir las características estructurales y biocinéticas del soporte desarrollado a partir de proteínas plasmáticas.
2. Evaluar el comportamiento de cultivos de condrocitos auriculares sembrados sobre los soportes antes mencionados, con respecto a la capacidad de rediferenciación y producción de cartilago *in vitro*.
3. Evaluar el comportamiento de cultivos de condrocitos auriculares sembrados sobre soportes e implantados como injertos libres de forma heterotópica en el dorso de animales inmunodeficientes, con respecto a la capacidad de producción de cartilago.
4. Evaluar la capacidad del injerto antes mencionado utilizado de forma autóloga para reparar defectos auriculares.

Material y métodos:

El trabajo se organizó en cuatro subestudios:

Subestudio I: Se produjeron soportes celulares a partir de sangre venosa de banco, mediante su desnaturalización por la adición de glutaraldehído y la posterior liofilización de la mezcla. Algunos soportes fueron analizados mediante microscopía electrónica de barrido para describir su microestructura. Otros fueron evaluados mediante un biorreómetro para medir su comportamiento ante la compresión. Por último, varios fueron implantados subcutáneamente en el dorso de un conejo de Nueva Zelanda. Posteriormente fueron extraídos periódicamente, pesados, fotografiados e incluidos para examen histológico para averiguar su velocidad de degradación.

Subestudio II: Se obtuvieron condrocitos a partir de biopsias de cartilago auricular de



conejos de Nueva Zelanda. Estos condrocitos fueron expandidos en monocapa, sembrados sobre soportes proteicos y cultivados en medio condrogénico para su rediferenciación durante tres meses. Transcurrido ese tiempo, se tomaron muestras para examen histológico y mediante microscopía electrónica de barrido.

Subestudio III: Se sembraron cultivos de condrocitos rediferenciados sobre soportes celulares, y estos constructos se implantaron subcutáneamente en el dorso de un ratón atímico. Dos meses después, se sacrificó el animal y se extrajeron los implantes para su examen histológico.

Subestudio IV: Se efectuaron defectos circulares de espesor completo en las orejas de 5 conejos de Nueva Zelanda. En algunos de esos defectos se introdujeron soportes sin células, en otros se introdujeron soportes sembrados con condrocitos autólogos expandidos y rediferenciados *in vitro*. Uno de esos cultivos se había marcado previamente con un retrovirus productor de Proteína Verde Fluorescente (GFP). Cuatro meses después, los animales fueron sacrificados y los sitios de implante fueron extraídos en bloque para su posterior estudio histológico e inmunohistoquímico.

Resultados:

Subestudio I. El análisis de las imágenes de microscopía electrónica de barrido mostraban una estructura esponjiforme con un tamaño de poro entre 150 y 300 μm y una casi completa interconectividad. La gráfica obtenida con el biorreómetro muestra un comportamiento del soporte más elástico que viscoso, con una σ crítica de 22 Pa. Se elaboró una gráfica con los pesos de los explantes de los soportes acelulares, mostrando una vida media de aproximadamente dos meses y una desaparición macroscópica del soporte a los cuatro meses de evolución.

Subestudio II. Se constató la rediferenciación morfológica de los condrocitos tras tres meses en medio de rediferenciación condrogénico. Sin embargo, no se observó producción de matriz extracelular.

Subestudio III: A los dos meses del implante subcutáneo, se observó cartílago maduro entre los poros del soporte. Este cartílago mostraba positividad en su matriz extracelular para colágeno tipo II y glicosaminglicanos, pero no para elastina.

Subestudio IV: El estudio de los sitios de implante de soportes acelulares mostró el relleno del defecto por tejido conectivo. Sin embargo, los sitios de implante de soportes con condrocitos aparecían rellenos por un material blanco y duro. El examen histológico de dicho material demostró la presencia de tejido cartilaginoso maduro junto con áreas de diferenciación ósea. En las muestras marcadas con GFP, aparecían marcadas las células del cartílago y las que estaban en las zonas de diferenciación ósea.

Discusión:

Frente a los métodos actuales de reconstrucción auricular, la Ingeniería Tisular surge como una opción deseable por la capacidad de producir cartílago a costa de una morbilidad mínima. Para ello, aún no se ha encontrado un soporte celular ideal. El soporte desarrollado por el Centro Comunitario cumple muchas de las propiedades ideales para la producción de cartílago, siendo fácil de elaborar, teniendo una microestructura favorable y siendo posible su utilización autóloga.

Utilizando la metodología de este trabajo, no se ha conseguido producir cartílago *in vitro*. Sin embargo la utilización de soportes sembrados con condrocitos como injertos libres en el dorso de conejos de Nueva Zelanda consigue producir tejido cartilaginoso maduro. La aplicación de estos injertos en defectos experimentales auriculares consigue su reparación con cartílago, observándose áreas de osificación asociadas a restos de soporte. El origen de esta osificación es desconocido, y puede limitar su aplicación clínica. Sin embargo una estrategia en dos tiempos, con un implante inicial en subcutáneo y un transplante eutópico posterior, puede evitar esa formación ectópica de hueso.

Conclusiones:

-El soporte desarrollado por el CCST y utilizado presenta características físicas y biocinéticas que lo hacen útil en estrategias de Ingeniería Tisular de cartílago.

-El soporte utilizado permite el cultivo y la rediferenciación de condrocitos *in vitro*, pero con el método utilizado no es posible producir cartílago *in vitro*.



-Es posible producir cartilago in vivo de forma ectópica (tejido subcutáneo) mediante el uso de soportes sembrados con condrocitos.
-Es posible reparar defectos experimentales en orejas utilizando soportes sembrados con condrocitos autólogos. Sin embargo, la producción ectópica de hueso, de etiología desconocida, limite el uso clínico de esta tecnología.

RESUMEN (en Inglés)

Introduction:

Reconstruction of congenital or acquired auricular defects poses a challenge to reconstructive surgery. Actual methods for this purpose can be summarized in autologous cartilage reconstructions, synthetic material-based ones or external prosthesis. Of these methods, costal cartilage-based reconstruction is nowadays the gold standard technique. But this method has its risks like implant extrusion, aesthetic deformity, donor site pain and pleural leakage.

To overcome the paucity of donor sites and to reduce harvest-associated morbidity, Tissue Engineering methods appear as an attractive reconstructive option. With this study, the usefulness of a novel albumin scaffold developed by Centro Comunitario de Sangre y Tejidos will be evaluated in cartilage tissue engineering strategies and their posterior clinical applications.

Objectives:

1. To measure structural and biokinetical characteristics of the plasma-derived scaffold.
2. To evaluate the behaviour of auricular chondrocytes cultures seeded onto previously mentioned scaffolds, in terms of redifferentiation ability and in vitro cartilage production.
3. To evaluate the behaviour of auricular chondrocytes cultures seeded onto scaffolds and implanted heterotopically as free grafts in the dorsum of immunodeficient animals, in terms of cartilage production.
4. To evaluate the ability of the previously mentioned graft to repair auricular defects in an autologous manner.

Materials and methods:

This work was divided in four substudies:

El trabajo se organizó en cuatro subestudios:

Substudy I: Scaffolds were made out of venous blood, by means of denaturalization by glutaraldehyde addition, and posterior lyophilization of the mixture. Some scaffolds were analysed with a Scanning Electronic Microscope (SEM) to describe their microstructure. Some others were analyzed using a biorheometer to test their behaviour under compression forces. Finally, other scaffolds were implanted subcutaneously in a New Zealand rabbit's dorsum. They were then taken periodically, weighed, photographed and



included for histological examination to determine its rate of degradation.
Substudy II: chondrocytes were obtained from biopsies of ear cartilage of New Zealand rabbits. These chondrocytes were expanded in monolayer, seeded on protein carriers and grown in chondrogenic medium for redifferentiation for three months. After this time, samples for histological examination and by scanning electron microscopy were taken.
Substudy III: redifferentiated chondrocyte cultures were plated on cell carriers, and these constructs were implanted subcutaneously on the back of a nude mouse. Two months later, the animal was sacrificed and samples for histological examination were taken.
Substudy IV: Full-thickness circular defects were made in the ears of 5 New Zealand rabbits. In some of these defects acellular scaffolds were introduced to serve as controls; in others autologous chondrocytes-seeded scaffolds were introduced. One of these chondrocyte cultures had previously been marked with a retrovirus producer of Green Fluorescent Protein (GFP). Four months later, the animals were sacrificed and the implantation sites were extracted in block for subsequent histological and immunohistochemical studies.

Results:

Substudy I. SEM imaging showed a spongiform structure with a pore size between 150 and 300 μm and an almost complete interconnectivity. Analysis of biorheometer results shows a more elastic than viscous behavior of the scaffold, with a critical σ of 22 Pa. A graph was made out with the weights of the acellular explants, showing a half life of about two months and complete disintegration at four months of evolution.

Substudy II. morphological redifferentiation of chondrocytes was found after three months in chondrogenic medium. However, no production of extracellular matrix was observed.

Substudy III: After two months of subcutaneous implantation, mature cartilage was observed between the pores of the support. This cartilage showed positivity in its extracellular matrix for glycosaminoglycans and type II collagen, but not for elastin.

Substudy IV: The study of the implant sites of acellular scaffolds showed connective tissue filling the defects. However, the implant sites of chondrocyte-seeded scaffolds appeared filled by a white hard material. Histological examination of the material showed the presence of mature cartilage tissue with areas of bone differentiation. In the samples marked with GFP, there was a positive marking for chondrocytes in the new formed cartilage and for cells in areas of bone differentiation.

Discussion:

Faced with the current methods of auricular reconstruction, Tissue Engineering emerges as a desirable option because of the ability to produce cartilage at the expense of minimal morbidity. But the search for an ideal scaffold still goes on. The support developed by the Centro Comunitario fulfills many of the ideal properties of this ideal scaffold, being easy to produce, having a favorable microstructure and with the possibility of using it in an autologous manner.

Using the methodology of this work we were not able to produce cartilage in vitro. However, the use of scaffolds seeded with chondrocytes as free grafts on the back of New Zealand rabbits manages to produce mature cartilaginous tissue. The application of these grafts in experimental auricular defects achieves cartilage repair, observing the production of areas of ossification associated to scaffold remains. The origin of this ossification is unknown, and may limit its clinical application. However a strategy in two stages, with an initial subcutaneous implant and a subsequent eutopic transplantation can avoid that ectopic bone formation.

Conclusions:

- The scaffold developed by Centro Comunitario has physical and biokinetic properties that make it useful in cartilage tissue engineering strategies.
- The scaffold used allows culture and redifferentiation of chondrocytes in vitro, but with the method used in this study is not possible to produce cartilage in vitro.
- It is possible to produce cartilage in vivo ectopically (subcutaneous tissue) using chondrocyte-seeded scaffolds.
- It is possible to repair experimental defects in ears using autologous chondrocyte-



Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado

Universidad de Oviedo



ASTURIAS
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL
AD FUTURUM

seeded scaffolds. However, ectopic bone production, of unknown etiology, may limit the clinical use of this technology.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE MEDICINA

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

Contenido

Agradecimientos	18
Introducción	22
Contexto del trabajo	24
Embriología: desarrollo auricular	24
Anatomía del pabellón auricular	25
Malformaciones y lesiones del pabellón auricular	26
Métodos y técnicas de reconstrucción auricular	28
Materiales aloplásticos.....	28
Prótesis auriculares	29
Ingeniería Tisular	29
El soporte celular del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos.....	37
Justificación del Proyecto.....	38
Hipótesis y Objetivos.....	42
Material y Métodos.....	48
Subestudio I. Medición de características físicas y biocinéticas del soporte.....	50
1. Producción del scaffold	50
2. Medición de características.....	50
3. Propiedades biocinéticas del soporte	50
Subestudio II. Cultivo in vitro de condrocitos de origen auricular.....	52
Obtención de células.....	52
Elaboración de soporte proteico.....	52
Expansión celular, rediferenciación y sembrado de los soportes.....	52
Identificación de cultivos.....	53
Marcaje con GFP	53
Formación de cartílago in vitro.	54
Subestudio III. Injerto de los cultivos celulares sobre soportes tridimensionales en el dorso de ratones atímicos.....	55
Formación de cartílago in vivo: transplante subcutáneo a ratón atímico	55
Subestudio IV. Injerto de los cultivos celulares sobre soportes tridimensionales en defectos auriculares de conejos de Nueva Zelanda.....	56
Reparación de cartílago in vivo: reparación de defectos en orejas de conejo de Nueva Zelanda.....	56
Resultados.....	58

Subestudio I. Medición de características físicas y biocinéticas del soporte	60
Elaboración de soportes.....	60
Características del scaffold.....	60
Subestudio II. Cultivo in vitro de condrocitos de origen auricular.....	73
Formación de cartílago in vitro.	73
Subestudio III. Injerto de los cultivos celulares sobre soportes tridimensionales en el dorso de ratones atímicos Fox1nu/Fox1nu.....	76
Formación de cartílago in vivo: trasplante ectópico subcutáneo en ratón atímico.	76
Subestudio IV. Injerto de los cultivos celulares sobre soportes tridimensionales en defectos auriculares de conejos de Nueva Zelanda.....	82
Reparación de cartílago in vivo: Reparación de defectos auriculares en conejos de Nueva Zelanda.....	82
Discusión	96
Células	99
Soporte.....	101
Microestructura y tiempo de degradación	103
Producción de cartílago in vitro	105
Producción de cartílago in vivo	106
Reparación de defectos experimentales.....	107
Conclusiones	112
Bibliografía	116

Agradecimientos

A Jose Rey, contigo empezó todo

A Rubén Álvarez, mi maestro, mi compañero de fatigas, mi amigo y mi hermano mayor. La práctica de la Cirugía Plástica no volverá a ser lo mismo sin ti

A Paz y Rosana, por su cariño y por las caras de pena y comprensión cuando me veáis saliente de guardia

A Eva, Sara, Marta y Verónica, porque el trabajo duro del que surge esta tesis lo habéis hecho vosotras, y sin vuestro esfuerzo y profesionalidad nada de esto hubiera sido posible

A Agustín, por haber mantenido algún animal de experimentación con vida

A Álvaro Meana, porque esta tesis está hecha gracias a ti y a pesar tuyo. Nunca es fácil tratar con un genio, pero creo que en tu caso lo he hecho bastante bien

A Luis Manuel Junquera, por su optimismo y ganas de trabajar. No cambies nunca

A mis padres, porque sin lo que me habéis enseñado no sería quien soy

A Pablo y Ana, por todo el tiempo que os pertenece por derecho y que os he robado para la realización de esta tesis. He contraído una deuda que nunca podré pagar del todo

Y por último a Cova, por todo lo demás. Gracias.

Introducción

Contexto del trabajo

Este trabajo pretende proporcionar una aproximación diferente a la reparación de defectos y a la reconstrucción del pabellón auricular, utilizando para ello técnicas de Ingeniería Tisular y un nuevo soporte proteico desarrollado por el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos. Antes de describir el trabajo realizado, se hará un repaso de la génesis y anatomía del pabellón auricular y a la epidemiología de sus lesiones y malformaciones, así como a los métodos de reconstrucción auricular disponibles en la actualidad.

Embriología: desarrollo auricular

Una mirada a la formación y desarrollo de la oreja nos conduce a los primeros estadios del desarrollo del embrión humano. Sobre la sexta semana de embriogénesis, se desarrollan seis protuberancias o tubérculos rodeando el primer surco branquial, a razón de tres en el primer arco branquial y tres en el segundo. Estos tubérculos, llamados de His en nombre de su descubridor en 1880, irán creciendo y cambiando de forma hasta la conformación de un pabellón auricular “adulto”, visible ya a partir de las primeras ocho-nueve semanas de vida.

En sus estudios de varios especímenes de embrión en diversas etapas de desarrollo, His concluyó que cada uno de los tubérculos contribuía a un componente determinado del pabellón auricular definitivo a través de una diferenciación y crecimiento preciso y determinado en el tiempo. En este modelo, los tubérculos del segundo arco branquial conforman la mayor parte de la oreja, los provenientes del primer arco branquial se desarrollan para formar el trago y parte de la raíz auricular, y la primera fisura o surco branquial configura el meato auricular externo. Esta hipótesis, aunque cuestionada a finales del siglo XIX y principios del XX por autores que observaron tubérculos branquiales semejantes en embriones de animales sin orejas como pollos o reptiles, ha prevalecido hasta nuestros días con ligeras modificaciones. Sin embargo, en estudios recientes (Cox et al., 2014; Porter and Tan, 2005) donde se marcaba el tejido de las protuberancias para su posterior identificación, se ha comprobado que mientras éstas dan lugar a determinadas partes de la oreja, el pliegue auricular libre (de donde derivan el hélix y la scapha) está formado principalmente por tejido caudal a las protuberancias del segundo arco branquial, y el meato auricular externo no deriva del primer surco branquial.

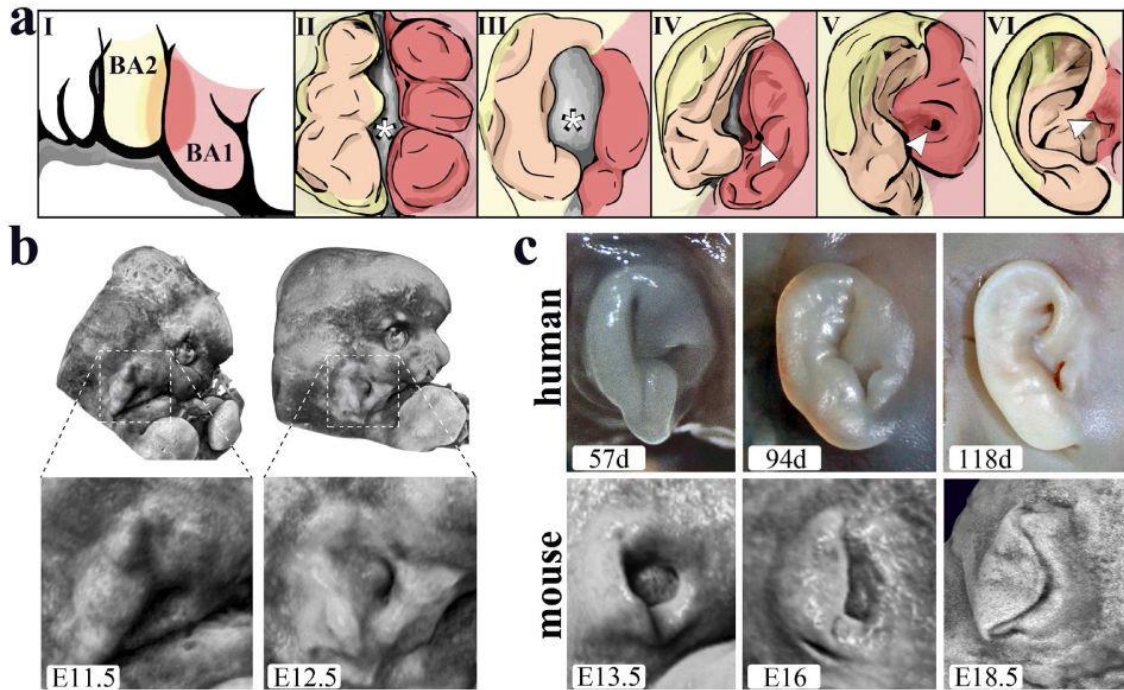


Figura 1. Tomado de Cox, TC et al. *The genetics of auricular development and malformation: new findings in model systems driving future directions for microtia research. Eur J Med Genet. August 57(8): 394–401, 2014*

Anatomía del pabellón auricular

Este desarrollo embriológico lleva a la formación del pabellón auricular, consistente en un armazón de cartílago conformado tridimensionalmente, y un recubrimiento de piel. Esta estructura cartilaginosa determina varios hitos topográficos, detallados en la figura 2 (Storck et al., 2014), que determinarán la apariencia del pabellón auricular normal. Estos relieves, por tanto, deben ser recreados a la hora de abordar una reconstrucción auricular, para lograr un resultado lo más natural posible.

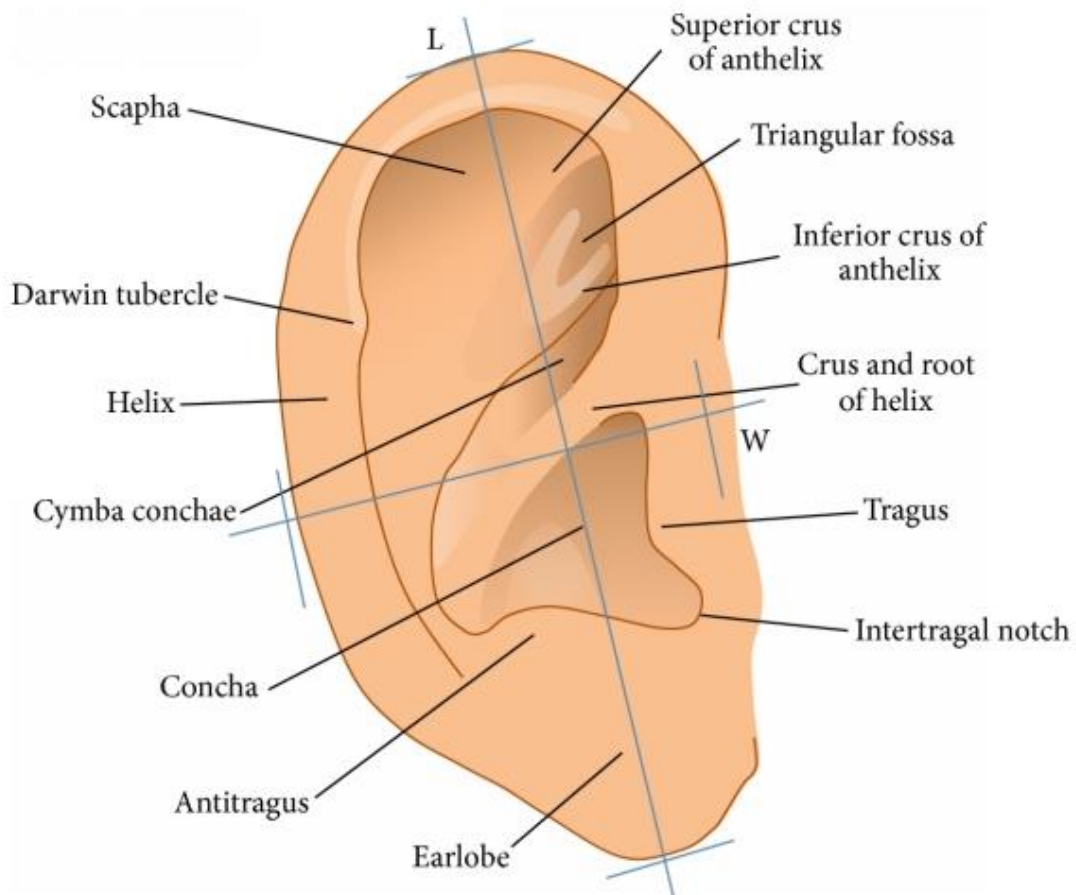


Figura 2. Anatomía externa del pabellón auricular. Tomado de Stork, K et al. Total Reconstruction of the Auricle: Our Experiences on Indications and Recent Techniques. Biomed Research International 1-15, 2014

Malformaciones y lesiones del pabellón auricular

Las malformaciones en la génesis del pabellón auricular son conocidas y están bien documentadas debido al estigma que producen en los niños y a la preocupación y afectación de los padres. Existen numerosas series sobre la incidencia de anotia/microtia en diversas poblaciones, situándose la incidencia media mundial en 1 caso por cada 7000 nacidos vivos (Staffenberg, 2003). En la Unión Europea esta incidencia es de aproximadamente 2 casos por cada 10000 nacidos vivos (Ciorba and Martini, 2006), aproximándose a los tres casos por cada 10000 nacidos vivos en EEUU (Tollefson, 2006). Existen factores de riesgo, sobre todo relacionados con la raza, la edad materna y la situación sociocultural, que pueden estar relacionados con déficits alimentarios o comportamientos que puedan favorecer la aparición de estas patologías. También existen una serie de síndromes que tienen estas patologías (microtia/anotia) en su espectro de expresión fenotípica (Bartel-Friedrich, 2015). Se enumeran en la tabla 1.

Síndrome/Enfermedad	Microtia (%)	Genes identificados
Auriculo-condilar	100	<i>PCLB4, GNAI3</i>
Bixler (hipertelorismo, microtia, fisura)	100	-
Bosley-Salih-Alorainy	33	<i>HOXA1</i>
Braquio-oculo-facial	20 severo,80 leve	<i>TFAP2A</i>
Braquio-oto-renal/Braquio-ótico	30-60/80-90	<i>EYA1, SIX1, SIX5</i>
CHARGE	80-100	<i>CHD7, SEMA3E</i>
Fraser	75-85	<i>FRAS1, FREM2, GRIP1</i>
Kabuki	80-85	<i>MLL2, KDM6A</i>
Klippel-Feil	60 (anom. auriculares)	<i>GFD6</i>
Aplasia laberíntica, microtia, microdontia	100	<i>FGF3</i>
Lacrimo-auriculo-dento-digital	70-80	<i>FGFR2, FGFR3, FGF10</i>
Disostosis Mandibulofacial	100	<i>HOXD</i>
Disostosis Mandibulofacial con microcefalia	98	<i>EFTUD2</i>
Meier-Gorlin	97-100	<i>ORC1, ORC4, ORC6, CDT1, CDC6</i>
Microtia, sordera, fisura palatina	100	<i>HOXA2</i>
Miller	100	<i>DHODH</i>
Nager	80	<i>SF3B4</i>
Oculoauricular	100	<i>HMX1</i>
Pallister-Hall	90	<i>GLI3</i>
Townes-Brocks	88	<i>SALL1</i>
Treacher-Collins	60-80	<i>TCOF1, POL1RC, POL1RD</i>
Wildervanck (Cervico-oculo-acústico)	25-50	<i>FGF13</i>

Tabla1: Síndromes asociados a microtia. Tomado de Congenital Auricular Malformations: Description of Anomalies and Syndromes. Bartel-Friedrich, S. Facial plast Surg 31(06): 567-580, 2015

La epidemiología de las lesiones auriculares adquiridas, normalmente por traumatismos o quemaduras, es menos conocida debido a que en su mayor parte son lesiones consideradas “menores” (por ejemplo en el contexto de un politraumatismo derivado de un accidente de tráfico) y por tanto son atendidas en el Servicio de Urgencias y no registradas. Se estima que en el 90% de las quemaduras en cabeza y cuello están implicadas las orejas, lo que resultaría en una incidencia de 67000 pacientes al año en EEUU (Osguthorpe, 1991). Existen pocos estudios descriptivos sobre lesiones traumáticas, y a pesar de sus limitaciones sí que describen las causas principales y la población diana de este tipo de lesiones (Steffen et al., 2007) ; el grupo poblacional afecto es predominantemente joven (edad 11-40) y masculino (2:1), y las causas más frecuentes son accidentes de tráfico (43%), accidentes domésticos (33%) y agresiones (14%). En este grupo de edad es donde una mutilación o deformidad permanente puede causar consecuencias psicológicas y psicosociales más importantes (Steffen et al., 2008), y donde una reconstrucción lo más estética posible cobra mayor importancia. Los beneficios sociales y psicológicos de una buena reconstrucción auricular ya han sido probados por varios estudios (Braun et al., 2010; Soukup et al., 2012).

Métodos y técnicas de reconstrucción auricular

Existen en la actualidad diversos métodos para reconstruir un pabellón auricular dañado o ausente. En su mayor parte, consisten en elaborar un armazón con forma de oreja e introducirlo en un bolsillo subcutáneo en el área temporomastoidea. A continuación se hará un repaso de las técnicas existentes y sus ventajas y desventajas.

Reconstrucción con cartílago costal autólogo

Desde su descripción (Tanzer, 1959) por vez primera por Tanzer, la reconstrucción con cartílago costal autólogo se ha convertido en el método más usado para este fin. Existen multitud de técnicas y refinamientos, pero tienen en común la obtención del cartílago proveniente de la sincondrosis de la sexta y séptima costilla y el de la octava costilla flotante para tallar un esqueleto con forma de oreja. Las técnicas quirúrgicas han ido evolucionando desde la descripción inicial de Tanzer, que proponía una reconstrucción en seis tiempos. Posteriormente, cirujanos como Brent (Brent, 1980a, 1980b) y Nagata (Nagata, 1993) lo modificaron a un procedimiento en dos tiempos, que con leves modificaciones y refinamientos constituye el gold standard actual. La técnica consiste básicamente en la obtención del cartílago previamente mencionado. La sincondrosis se utiliza para formar la fosa triangular y la fosa escafoidea, y el cartílago proveniente de la octava costilla proporciona la proyección del hélix, la crus anterior y posterior del antehélix, el trago y el antitrago. Este armazón se introduce en un bolsillo subcutáneo en el área temporomastoidea, ya sea disecado en el momento o logrado mediante un expansor tisular, y se deja con un drenaje con vacío para conformar y adaptar la piel al cartílago subyacente durante al menos una semana. En un segundo tiempo, unos meses después, se introduce una cuña de cartílago obtenido en la primera intervención bajo el esqueleto auricular para darle proyección y separarlo del plano del cráneo. Esta intervención requiere de una curva de aprendizaje para tallar el armazón, y presenta riesgo de sufrimiento del bolsillo y extrusión del implante. Sin embargo, las complicaciones más temidas vienen dadas por la obtención del cartílago. La perforación de la pleura con el consiguiente pneumotórax, la deformidad estética o el dolor persistente de la zona donante son las complicaciones más importantes publicadas en la literatura. Aun así, el uso de tejido autólogo en la reconstrucción disminuye el riesgo de infección y extrusión del implante, y lo hace el método preferido para la reconstrucción auricular hoy en día.

Materiales aloplásticos

Se han intentado utilizar otros materiales para evitar los riesgos relacionados con la obtención del cartílago costal. En los años 60 y 70 se probaron diversos implantes fabricados a base de

Silicona (Silastic) (Cronin, 1966), pero pronto fueron abandonados debido a las altas tasas de infección, reacción a cuerpo extraño y extrusión (Lynch et al., 1972). Más adelante, la utilización de matrices de polipropileno poroso (Medpor) ha surgido como alternativa al Silastic. Este material tiene un tamaño de poro entre 40 y 200 μm , que permite la invasión de tejido nativo. El Medpor viene presentado como un bloque que se puede tallar a la medida de la oreja a reconstruir. Mediante un procedimiento en un solo tiempo, se coloca el implante en el área temporomastoidea y se cubre con un colgajo vascularizado, habitualmente un colgajo temporoparietal.

Aunque el uso del Medpor disminuye las tasas de infección y extrusión respecto al Silastic, todavía son mayores que las del cartílago costal y presentan además un riesgo importante de reacción a cuerpo extraño y fibrosis capsular (Cenzi et al., 2005), lo que lo relega a un método de segunda línea.

Prótesis auriculares

Otra opción para pacientes que por su patología o características concomitantes no sean candidatos a la reconstrucción quirúrgica es la reconstrucción protética. Una prótesis externa de silicona tallada de manera invertida respecto a la oreja sana, o según un patrón si el defecto es bilateral, se fija a la zona mediante adhesivo o tornillos osteointegrados de titanio. El primer método no precisa cirugía, pero el sudor y las fuerzas de cizallamiento pueden hacer que la oreja protésica se caiga. El método de fijación mediante tornillos de titanio precisa de una intervención quirúrgica para implantarlos, pero mejora de tal manera la colocación y sujeción del implante que habitualmente las ventajas compensan la operación. Éste es un método reservado como último recurso, en paciente con malas condiciones locales de los tejidos, como grandes quemados o con radioterapia intensa, pacientes con malas condiciones de salud que contraindiquen cirugías más agresivas, o pacientes con un tumor activo (Wilkes and Wolfaardt, 1994).

Ingeniería Tisular

Ante esta problemática, la Ingeniería Tisular (IT) surge como posible solución. Como refiere una de sus definiciones, la IT es un área científica interdisciplinaria cuyo fundamento esencial es el uso de células vivas, la manipulación del entorno extracelular, la creación de substitutos biológicos y su consecuente implantación en el cuerpo. El objetivo de esta ciencia es reparar, reemplazar, mantener, o mejorar la función particular de un órgano o tejido. Aplicado al tema de este trabajo, la posibilidad de obtener células del paciente mediante una biopsia con mínima morbilidad, formar con ellas un armazón tridimensional configurado en la forma deseada e

implantarlo sin generar respuesta inmune parece una opción ideal que no requeriría una gran curva de aprendizaje para obtener resultados óptimos.

A priori, los precedentes de esta opción terapéutica son favorables. Desde el primer cultivo documentado de condrocitos (Green and Dickens, 1972), se han sucedido los intentos de obtener cartílago in vitro o in vivo, con diversos grados de éxito. Para llevar a cabo una estrategia de IT de cartílago basada en cultivos celulares, son necesarios dos factores primordiales:

1. *Células*
2. *Soporte celular*

Células

El tejido cartilaginoso maduro se puede obtener a partir de varios tipos celulares, como las células madre o *stem-cells* de origen embrionario, las células madre o *stem-cells* mesenquimales adultas, y los condrocitos o sus precursores inmediatos.

Las células madre o *stem-cells* de origen embrionario tienen la capacidad de formar cualquier tejido presente en el organismo, sin embargo su uso conlleva problemas éticos que no pueden ser pasados por alto fácilmente. En el caso de las *stem-cell* mesenquimales adultas (MSC), pueden ser obtenidas a partir de tejido maduro sin originar este tipo de problemas, por lo que se han convertido en una fuente de células para su uso en IT (Ciorba and Martini, 2006). A partir de un aspirado de médula ósea, una biopsia de periostio o tejido adiposo obtenido por escisión directa o por lipoaspiración, es posible aislar células pluripotenciales y diferenciarlas hacia una estirpe celular mesenquimal determinada, como se demostró en anteriores estudios (Mizuno et al., 2002; Zuk et al., 2002, 2001) y se comprobó en el trabajo de investigación previo (DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE INGENIERÍA TISULAR DE GRASA – UNIVERSIDAD DE OVIEDO, 2005). La existencia de un precursor común, el preadipocito, hace posible producir a partir de células pluripotenciales de una estirpe determinada (por ejemplo, presentes en la grasa o en médula ósea) células de otra estirpe mesenquimal, sometiendo las MSCs a diferentes medios de cultivo o factores estimuladores (Sekiya et al., 2001). El reto que plantea el uso de MSCs u otras *stem-cells* es dirigir la diferenciación a una determinada estirpe celular a través de mecanismos bioquímicos determinados, lo que no acaba de ser un proceso totalmente comprendido (Stoddart et al., 2009). Persiste además el riesgo de originar una proliferación incontrolada o indefinida que pueda llevar a la formación de un tumor.

Los condrocitos se han mostrado en estudios anteriores (Kaufman and Tobias, 2003) como células de fácil cultivo en monocapa y bajos requerimientos nutricionales, lo que las hace ideales

para su implantación como producto de IT. Sin embargo, al igual que ocurre con otros tipos celulares maduros, su cultivo y expansión en monocapa, necesario para obtener un número de células suficiente para su uso clínico, produce su desdiferenciación a tipos celulares más primitivos. Estos tipos celulares tienen una morfología más parecida al fibroblasto, con una apariencia fusiforme, y son reconocibles histológicamente por cambiar la producción mayoritaria de colágeno tipo II propia del condrocito maduro por la del colágeno tipo I (Binette et al., 1998). Ante estos hechos, debemos asumir que toda estrategia para la producción de cartílago basada en cultivos de condrocitos deberá necesariamente contener una fase de rediferenciación para conseguir implantar células maduras que produzcan tejido cartilaginoso. Esta fase de rediferenciación no se puede llevar a cabo en un cultivo en monocapa; se ha demostrado que sólo en un entorno tridimensional es posible la rediferenciación y proliferación de los condrocitos (Curran et al., 2006; Dalby et al., 2007); este hecho lleva a definir un segundo requisito para este producto de IT: el soporte celular.

Soporte celular

En la biología normal de los tejidos vivos, las células se mantienen en un continuo proceso de remodelado; de acuerdo a su información genética y su entorno forman estructuras e intercambian con el medio sustancias para su nutrición, intercambio gaseoso y eliminación de detritus.

Los cultivos celulares no pueden ser incorporados directamente del medio de cultivo al organismo receptor, ya que existen una serie de factores locales que dificultan esta transición. Para efectuar este proceso, las células deben estar incluidas en una estructura que les proporcione el soporte y el medio necesario para poder subsistir hasta integrarse en el tejido receptor. Estas sustancias son llamadas soportes celulares o *scaffolds*, y pueden abarcar multitud de formas, desde una solución salina hasta una fibra sintética.

Las características básicas que un soporte celular debe tener para ser utilizado son: alta porosidad, gran superficie de contacto celular, estructura consistente, forma tridimensional y biocompatibilidad. Sus funciones deben ser proporcionar un microambiente favorable durante el implante y diferenciación de los cultivos, y dirigir el crecimiento celular ya sea de los tejidos adyacentes o de las células sembradas en él. Para esto el soporte debe proveer una adecuada adhesión celular y favorecer la proliferación y la diferenciación mediante una estructura tridimensional determinada (Binette et al., 1998). Hay muchos materiales utilizados como *scaffolds*, sin embargo, los materiales biodegradables son preferidos debido a que su papel en el trasplante de cultivos celulares usualmente es temporal, y deben desaparecer de forma

predecible para permitir la invasión de nuevos vasos. Esta invasión vascular va a ser la responsable última de la supervivencia y la implantación de los cultivos celulares en el organismo receptor.

Tipos de soportes celulares disponibles actualmente

Como se mencionó anteriormente, existen descritos multitud de soportes celulares para IT. A continuación se describen varios, sin pretender ser una relación exhaustiva de todos los existentes:

Polímeros sintéticos

Muchos de los scaffolds usados en las primeras investigaciones para cultivar cartílago se basaron en el uso de polímeros sintéticos, poli (α hidroxiesteres), como el ácido poli(L láctico) (PLLA), ácido poliglicólico (PGA), y el copolímero ácido poli (DL láctico-glicólico). Estas sustancias forman entramados abiertos y porosos de tipo fibroso o esponjiforme que permiten el soporte de las células en cultivo, con intercambio de nutrientes y excreción de desechos. Una de las ventajas de los polímeros sintéticos respecto a los naturales es que se puede individualizar y modificar sus propiedades estructurales y biocinéticas, cambiando la composición de los polímeros. Así, el PGA es el polímero más hidrofílico y tiene un tiempo de degradación de 5 semanas, mientras que el PLLA es el más hidrofóbico y presenta tiempos de degradación de hasta tres años (Lu et al., 2000). Estudios previos han demostrado que utilizando copolímeros de PGA/PLLA en diferentes cantidades, es posible modificar y controlar la forma y el tiempo de degradación de los mismos (Moran et al., 2003). Asimismo proveen a los cultivos de un soporte que se degrada a un ritmo constante y controlado, incluso ajustable, con metabolitos no tóxicos, y que permite la creación de una matriz extracelular. Varios de estos constructos de polímeros de PGA sembrados con condrocitos han sido implantados en varios modelos con diversos grados de éxito. Se ha visto que el implante de constructos de PGA moldeados en determinadas formas mantienen dichas formas in vivo en ratones atímicos (Cao et al., 1997). Otros estudios han comprobado la formación de cartílago en un molde auricular utilizando como soporte celular un polímero de PLLA y poli- ϵ -capronolactona, presentando una mayor integridad estructural a largo plazo (Isogai et al., 2004). Esta evidencia viene a demostrar la capacidad de los soportes celulares formados por fibras poliméricas biocompatibles sembradas con condrocitos para producir nuevo cartílago in vivo.

Aunque esta clase de polímeros es útil para la ingeniería tisular de cartílago, este tipo de scaffold tiene sus limitaciones que pueden restringir su uso en reparación e implantes de cartílago. Estos polímeros son hidrofóbicos, lo que conlleva que tengan una pobre adhesión

celular (Webb et al., 1998); este hecho implica la necesidad de utilizar un gran número de células a lo largo del proceso de siembra, lo que es una desventaja importante dado que el cartílago es un tejido con poca celularidad, y clínicamente sólo se podrían obtener pequeñas biopsias de cartílago para conseguir las células sin crear mucha morbilidad. De esta forma, se precisaría expandir mucho el número de células cultivadas, con la consiguiente desdiferenciación de los cultivos. Se ha intentado mejorar este aspecto por medio de la modificación de la superficie de los polímeros, incorporando moléculas bioseñalizadoras, proteínas que favorezcan la adhesión celular, componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento. También ha habido problemas con determinados compuestos de PGA y PLLA a la hora de mantener una forma determinada in vivo; la resistencia mecánica baja de estos polímeros hace que la forma tridimensional original se vaya deteriorando con el tiempo, haciendo imposible su aplicación clínica (Chen et al., 2004). Por último, se ha visto que la implantación de estos polímeros en compartimentos vascularizados de sujetos inmunocompetentes puede provocar una fuerte reacción a cuerpo extraño similar a la observada alrededor del material de sutura de poliéster.

Scaffolds biológicos naturales

Dentro de este grupo, se encuentran compuestos naturales que se asemejan a la matriz extracelular del cartílago. Estos polímeros naturales presentan ventajas debido a su superficie y a su estructura tridimensional fibrosa altamente hidrófila. Las fibras de estos soportes facilitan el sembrado de condrocitos en su interior, mientras que las características bioquímicas de su superficie favorecen la adhesión y la proliferación celular. Sin embargo, presentan algunas desventajas, relacionadas con su poca resistencia mecánica, su degradación rápida, y su posible antigenicidad.

Dentro de este tipo de soportes se encontrarían aquellos derivados del colágeno, del ácido hialurónico, del quitosano e hidrogeles. También es posible modificar estos materiales mediante entrecruzamiento para modificar o mejorar características mecánicas y propiedades biocinéticas como la degradación.

El colágeno es la biomolécula estructural predominante en la matriz extracelular del cartílago, lo que lo hace una elección ideal como material de soporte en la ingeniería tisular. Las esponjas de colágeno tienen muchas propiedades útiles como scaffolds para la formación de cartílago, como la porosidad, la biodegradabilidad, la biocompatibilidad y una mayor adhesión celular respecto a los polímeros sintéticos (Chen et al., 2014a). Se han descrito muchos métodos de preparación de scaffolds de colágeno, la mayor parte de los cuales se producen a partir de tejidos animales, como el colágeno tipo I del tendón bovino (Nöth et al., 2007)). Es posible

también modificar químicamente las propiedades biomecánicas y biológicas de los scaffolds de colágeno para añadir ciertas características que promueven la formación de cartílago. Es posible modificar el tamaño del poro mediante cambios en el proceso de congelación- secado necesario para su elaboración. También pueden ser modificados añadiendo factores de crecimiento exógenos al entramado para promover el crecimiento de los condrocitos y la formación de matriz extracelular, como el bFGF.

Se han usado entramados abiertos de colágeno para formar nueva matriz cartilaginosa, mostrando resultados favorables con respecto a la adherencia de los condrocitos, a la capacidad de éstos de mantener su fenotipo de condrocitos diferenciados y a la producción de cartílago in vivo (De Franceschi et al., 2005). Se ha visto que en comparación con los scaffolds de polímeros sintéticos, las esponjas de colágeno promueven la formación de fibras de colágeno, mientras que los sintéticos promueven la síntesis de proteoglicanos.

Sin embargo, a pesar de su atractivo como material biológico para la fabricación de scaffolds, las esponjas de colágeno presentan varias desventajas, como su poca resistencia mecánica y el hecho de que pueden causar importantes reacciones de cuerpo extraño con el resultado de la formación de una fina cápsula de tejido fibroso que rodea la nueva matriz extracelular formada e interfiere con su integración en el lecho receptor.

El hialuronano es uno de los principales componentes del mesenquima indiferenciado en el embrión en desarrollo y de la matriz extracelular del cartílago. Se ha observado que ayuda a la proliferación de las células progenitoras mesenquimales y promueve su diferenciación a condrocitos. Además, se cree que el hialuronano en el cartílago juega un papel importante en el microambiente físico afectando a la función de los condrocitos. Es posible que cree un entorno durante la reparación del cartílago que haga recapitular procesos ocurridos durante el desarrollo embrionario.

El hialuronano puede ser formulado de varias maneras que produzcan un entorno favorable para la generación de cartílago, permitiendo la síntesis de componentes de la matriz extracelular y la diferenciación de las células progenitoras. Existen varios derivados del hialuronano, algunos de los cuales están comercializados, como el HYAFF-11 (Fidia Advanced Biopolimer, Abano Terme, Italy) (Grigolo et al., 2001) o el HYAFF- 7 (Fidia Advanced Biopolimer, Abano Terme, Italy), que se diferencian en los enlaces químicos entre sus fibras, dándoles diferentes calibres de malla y diferentes tiempos de degradación in vivo e in vitro.

Hidrogeles

La incapacidad para suministrar condrocitos cultivados a un lecho receptor mediante técnicas mínimamente invasivas al usar polímeros promovió investigaciones en busca de otro tipo de scaffolds poliméricos, como los hidrogeles. Los hidrogeles son coloides gelatinosos que presentan una estabilidad tridimensional cuando se mantienen en unas determinadas condiciones. Se consiguen mezclando un polímero soluble en agua y añadiendo un agente agregante para convertir la mezcla en un gel. Mientras el polímero se gelifica, suele haber normalmente suficiente tiempo para moldear la forma tridimensional final del hidrogel. Además, al existir en fase líquida, estos polímeros tienen la posibilidad de su inyección en el lecho receptor, efectuando su depósito mediante métodos mínimamente invasivos (Peretti et al., 2006). Los hidrogeles han probado su valía a la hora de proveer a los condrocitos de un entorno confortable y tridimensional donde inmovilizarlos para cultivo. Mediante la suspensión de los condrocitos en una matriz acuosa altamente porosa, pueden mantener su fenotipo diferenciado y son capaces de producir gran cantidad de macromoléculas de la matriz extracelular.

Este tipo de soportes se pueden clasificar en biológicos y sintéticos. A continuación se realiza un somero repaso a los más significativos.

Hidrogeles biológicos:

- Alginatos unidos iónicamente, como el alginato sódico, un polisacárido extraído de un alga, que forma hidrogeles en presencia de iones de calcio. Se ha descrito como vehículo para la introducción de condrocitos para la formación de cartílago in vivo (Chang et al., 2001), pero con limitado éxito ya que sólo ha logrado formar “islas” de cartílago de calidad indeterminada.
- Hidrogeles de fibrina, obtenidos a partir de muestras de sangre autólogas, utilizados como scaffolds para el cultivo de cartílago. La fibrina es fácilmente obtenida a partir de la interacción de la trombina y el fibrinógeno al coagular la sangre. Se trata de un material biocompatible, puede utilizarse como agente inyectable que vehiculice los condrocitos cultivados, presentando una buena interacción matriz-célula a través de las uniones producidas por la integrina (Peretti et al., 2006), y añadiéndole un agente antifibrinolítico como la aprotinina se puede controlar su degradación. Sin embargo, el principal problema respecto a este material es su pobre resistencia mecánica y rápida degradación in vivo.

Hidrogeles sintéticos:

- Polímeros de óxido de polietileno (PEO), que poseen una variabilidad menor que los naturales y por tanto se tiene un mayor control y mantenimiento del volumen. Las moléculas de PEO pueden ser unidas entre sí añadiéndoles un activador fotosensible, que unido a los extremos de las cadenas hace que se gelifique al contacto con la luz ultravioleta. Esta polimerización in situ permite a estos hidrogeles ser inyectados dentro del sitio receptor y ser esculpidos allí. Elisseeff demostró que constructos de condrocitos y PEO podían ser inyectados subcutáneamente, moldeados en la forma deseada y polimerizados transdérmicamente mediante la aplicación de luz ultravioleta (Elisseeff et al., 2001).
- Otros hidrogeles sintéticos son el pluronic F-127, un copolímero termosensible hecho de la combinación de PEO y poli (óxido de propileno) (Cao et al., 1998), y el PVA ; estos polímeros pueden ser diseñados para permitir la implantación sencilla mediante métodos no invasivos, para proporcionar una estabilidad mecánica y estructural manteniendo sus propiedades de transporte de nutrientes y para permitir la adopción de formas complejas que se adapten al defecto con una adhesión aceptable para tratar defectos craneofaciales y articulares.

En todos estos modelos de hidrogeles el principal caballo de batalla es el mantenimiento de la integridad estructural, ya que el comportamiento físico y mecánico de un gel depende en gran medida de la densidad de las uniones cruzadas entre polímeros, que controla el contenido de agua. Se ha intentado combinar estructuras de polímeros como

Materiales inertes no reabsorbibles

Para mejorar las propiedades biomecánicas del cartílago producido mediante ingeniería tisular, se han investigado numerosas técnicas que seguían tres líneas o estrategias básicas:

- Mejorar las propiedades biológicas de la matriz cartilaginosa extracelular
- Propocionar soporte interno para el cartílago neoformado
- Añadir soporte externo (pseudopericondrio) al cartílago neoformado

En este sentido, se han probado scaffolds internos de varios materiales inertes como son el polietileno de alta densidad, el acrílico suave, el polimetilmetacrilato y el silastic, ya sea en su forma convencional o extrapurificado; sin embargo, el uso de este tipo de materiales se

ha relacionado con reacciones a cuerpo extraño y extrusiones del implante, por lo que en la actualidad su uso no es frecuente.

El soporte celular del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos

Como se ha expuesto anteriormente, dentro de las propiedades ideales de un scaffold estarían su biocompatibilidad, su capacidad para la adhesión, proliferación y diferenciación celular, su degradación de forma predecible y no tóxica, una estructura tridimensional estable y moldeable y una fabricación simple y barata. Pensando en soportes autólogos que cumplan estas propiedades, la sangre se muestra como un material ideal. Fácil de obtener, con poca morbilidad, la fibrina disponible en su interior ya ha sido utilizada previamente mostrando una buena adhesión y proliferación celular. En este sentido, estudios previos han usado suspensiones de condrocitos cultivados en un coágulo sanguíneo inyectado en un organismo receptor (Kim et al., 2004). Sin embargo, el coágulo utilizado como soporte presenta la desventaja de una resistencia mecánica muy pobre, unido a una degradación rápida. Con vistas a mejorar estas características, se propuso fabricar un soporte a partir de la fracción proteica de la sangre, que pudiera ser utilizado de forma autóloga, y que tuviera propiedades mecánicas y biocinéticas que lo hicieran válido para el trasplante de cultivos de condrocitos. Para ello se llevó a cabo una desnaturalización mediante la adición de glutaraldehído, y una liofilización de la mezcla, obteniendo una estructura esponjiforme porosa, más resistente a la deformación y de una vida media mayor. Dicha estructura desarrollada por el Centro Comunitario del Principado de Asturias u otra similar han sido empleadas en conjunción con otras estirpes celulares (osteocitos, adipocitos, miocitos) en otras estrategias de IT (Elowson et al., 2013; Gallego et al., 2010; Gallego et al., 2010). Sin embargo, esta es la primera vez que se emplea para el cultivo, la rediferenciación y el trasplante de condrocitos con el fin de producir cartílago.

Justificación del Proyecto

Por lo expuesto hasta ahora, justificamos el inicio del presente trabajo de investigación por la necesidad clínica de disponer de cartílago auricular autólogo, obtenido mediante técnicas de cultivo *in vitro*. El reto científico, no sólo incluye la posibilidad técnica de lograr el cultivo de condrocitos funcionantes, sino que implica la elaboración de un soporte tridimensional proteico para su diferenciación así como la valoración *in vitro* y mediante experimentación animal de su viabilidad clínica, capacidad de producción de tejido cartilaginoso y utilidad para reparación de defectos *in vivo*.

Hipótesis y Objetivos

En el camino a recorrer para la realización de la presente Tesis Doctoral, nos fuimos planteando una serie de preguntas de investigación sobre el tema que, sin lugar a dudas, estimularon nuestro esfuerzo:

1. ¿Podríamos elaborar un soporte celular a partir de proteínas de la sangre para su empleo en Ingeniería Tisular? ¿Cuáles serían las características de dicho soporte en relación a su estructura microscópica, método de degradación y vida media in vivo?
2. ¿Podríamos emplear como soporte tridimensional para el crecimiento y diferenciación de cultivos de condrocitos y para la formación de cartílago in vitro la matriz autóloga antes mencionada?
3. Tras la aplicación de nuestro constructo como injerto libre heterotópico en animales inmunosuprimidos ¿serán capaces de formar cartílago?
4. ¿Será posible reconstruir con nuestro producto de I.T. utilizado como injerto libre defectos auriculares en conejos?

En consonancia con lo anterior la expresión operativa de las hipótesis planteadas sería la siguiente:

1. El soporte elaborado a partir de proteínas plasmáticas presenta unas características estructurales y biocinéticas del soporte favorables para su utilización in vivo en técnicas de I.T.
2. Es posible la formación de cartílago mediante técnicas de cultivo in vitro de condrocitos de origen auricular.
3. La utilización de una matriz proteica tridimensional susceptible de elaboración autógena, favorece el crecimiento y la diferenciación de los condrocitos cultivados, tanto in vitro como in vivo.
4. El comportamiento del material cultivado aplicado como injerto libre en el dorso de animales inmunodeprimidos o en defectos auriculares de conejos de Nueva Zelanda pone en evidencia la formación cartílago diferenciado.

En consecuencia el presente trabajo tiene cuatro objetivos princeps:

1-. La medición, mediante el estudio microscópico, la utilización de un biorreómetro y el implante in vivo de soportes acelulares, de las características estructurales y biocinéticas del soporte antes mencionado.

2-.La evaluación del comportamiento de condrocitos obtenidos mediante biopsia al ser cultivados sobre un novedoso soporte tridimensional, utilizando para ello técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas y microscopía electrónica de barrido, con vistas a su diferenciación y producción de cartílago.

3-.La evaluación del comportamiento de los cultivos in vitro de condrocitos sembrados sobre el soporte al ser implantados de forma heterotópica como injerto libre en un animal inmunodeficiente.

4-.La evaluación, mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, del comportamiento del injerto antes descrito utilizado de forma autóloga en la reparación in vivo de defectos auriculares de conejos de Nueva Zelanda.

La organización de los mentados objetivos nos ha llevado a la sistematización operativa de cuatro subestudios, con sus correspondientes objetivos que podemos explicitar de la siguiente manera:

Subestudio I. Medición de características físicas y biocinéticas del soporte

1. Elaboración de soportes tridimensionales a partir de la fracción proteica de sangre venosa.
2. Evaluación de dichos soportes mediante microscopía electrónica de barrido y biorreómetro para obtener los parámetros estructurales que lo definan.

3. Implante subcutáneo en animal inmunocompetente (conejo de Nueva Zelanda) de varios soportes, y explante mensual, con documentación de los cambios morfológicos de volumen y peso, para objetivar la velocidad de degradación del mismo y evaluar mediante el estudio histológico de las muestras su método de degradación.

Subestudio II. Cultivo in vitro de condrocitos de origen auricular.

1. Desarrollo y análisis comparativo del cultivo primario de condrocitos obtenidos a partir de pequeñas biopsias de la oreja de conejos.
2. Elaboración de un soporte tridimensional original de naturaleza proteica (scaffold), susceptible de fabricación con material autólogo. Comparación de su comportamiento in vitro en cultivos de condrocitos.

Subestudio III. Injerto de los cultivos celulares sobre soportes tridimensionales en el dorso de ratones atímicos.

1. Estudiar el comportamiento histológico, histoquímico e inmunohistoquímico de los cultivos obtenidos tras su aplicación como injerto libre subcutáneos en el dorso de ratones atímicos (*Foxn1nu/Foxn1nu*), sacrificados tras 60 días de la cirugía.

Subestudio IV. Injerto de los cultivos celulares sobre soportes tridimensionales en defectos auriculares de conejos de Nueva Zelanda

1. Estudiar el comportamiento histológico e inmunohistoquímico de las muestras obtenidas tras su aplicación como injertos libres para reparar defectos auriculares de conejos sacrificados a los 120 días del injerto.

Material y Métodos

Subestudio I. Medición de características físicas y biocinéticas del soporte

1. Producción del scaffold

Para fabricar el soporte, se utilizaron 10 mililitros (ml) de sangre venosa obtenidos de los laboratorios del Banco de Sangre (Centro Comunitario de Sangre y Tejidos, Asturias, España). La muestra se mantuvo durante 30 minutos a 37° C para producir un coágulo de fibrina. Después se sometió a la muestra a centrifugado a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos. El suero obtenido (5 ml) se desnaturalizó con 0,5 ml de glutaraldehído al 25% (Merck, Darmstadt, Alemania) para producir entrecruzamiento protéico y se transfirió a una jeringuilla desechable de 5ml. La solución de suero y glutaraldehído se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta su solidificación. Tras ello, se introdujo en el congelador y se mantuvo a -70°C hasta el día siguiente. Se cortó la jeringuilla desechable y la solución congelada se liofilizó durante 48 horas y después se rehidrató en concentraciones descendentes de etanol (100%-90%-80%), una hora en cada una. La esponja cilíndrica obtenida se cortó en secciones de 5 milímetros (mm) de diámetro y 2 mm de espesor, y se esterilizaron sumergiéndolas en etanol al 70% durante 8 horas. Finalmente, el scaffold se neutralizó en medio de cultivo compuesto de DMEM (Biochrom, Berlín, Alemania).

2. Medición de características

Se realizó un test de resistencia mecánica con un reómetro de tensión controlada (Bohlin CS-10, East Brunswick, Nueva Jersey, EEUU) con una configuración de cono/placa de 4/40 (diámetro de placa de 40 mm) La tensión aplicada varió entre 10-1 Pascales (Pa) y 300 Pa. Se obtuvieron curvas de deformación y tensión para evaluar el módulo elástico, el módulo viscoso y el punto crítico σ .

Uno de los soportes se espolvoreó con oro y se examinó utilizando un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 6100, Tokyo, Japón) para definir sus características estructurales microscópicas.

3. Propiedades biocinéticas del soporte

Para este subestudio, se utilizó un conejo de Nueva Zelanda de un peso aproximado de 2,5 kg. En cada intervención, y según el protocolo del Bioterio de la Universidad de Oviedo que se usó durante el resto del trabajo, se anestesió al animal mediante inyección intravenosa de Ketamina a razón de 15 mg/kg y Medetomidina 0,18 mg/kg como inducción anestésica. Tras la intubación del animal o la colocación de una mascarilla para ventilación, se mantuvo al animal dormido mediante la inhalación de un flujo de 2 L/minuto de oxígeno más isofluorano 1,5-2%. A cada animal también le fue administrado una dosis subcutánea de 0,05-0,07cc de tartrato de

butorfanol y una dosis intramuscular de 0,1cc de fluxinin-meglumine (FYNADINE; Merck/Darmstadt, Alemania) como analgesia intra- y postoperatoria. Además, como profilaxis antibiótica se le pautó una dosis preoperatoria y otra postoperatoria de cefazolina 50 mg/kg.

Para evaluar el comportamiento in vivo del soporte y medir su velocidad de degradación, se implantaron seis soportes acelulares de 5 mm de diámetro y 2 mm de espesor (peso medio aproximado 338mg) marcados con un clip vascular para su posterior identificación (peso 14 mg) en el plano subcutáneo del lomo del conejo de Nueva Zelanda a través de incisiones separadas. Las heridas se cerraron con puntos sueltos de seda 0 y se siguió el protocolo habitual de cuidados del Bioterio, sin hallar incidencias. El animal fue llevado a quirófano de nuevo al transcurrir un mes, y se realizó la biopsia de uno de los implantes, extrayendo el implante en bloque y documentando el resultado mediante fotografía. La muestra fue pesada en una balanza de precisión junto con el clip vascular, y se incluyó posteriormente en parafina para conservación. Esta intervención se repitió al cumplir los 2,3 y 4 meses, momento en el que se interrumpió el experimento al no hallarse resto objetivable de soporte.

Subestudio II. Cultivo in vitro de condrocitos de origen auricular.

- 1. Desarrollo y análisis comparativo del cultivo primario de condrocitos obtenidos a partir de pequeñas biopsias de la oreja de conejos.*
- 2. Elaboración de un soporte tridimensional original de naturaleza proteica (scaffold), susceptible de fabricación con material autólogo. Comparación de su comportamiento in vitro en cultivos de condrocitos*

Obtención de células

Para la obtención de condrocitos, se utilizaron biopsias de cartílago auricular de 1 centímetro cuadrado (cm²) de tamaño tomadas de animales de experimentación utilizados en otros estudios ya sacrificados (conejos de Nueva Zelanda). Tras su obtención, las piezas de cartílago se lavaron y sumergieron en suero salino 0,9% para su transporte inmediato al laboratorio. Una vez allí, se introdujeron en RPMI complementado con antibióticos y antifúngicos (penicilina 200 U/ml, estreptomina 200 µg/ml, anfotericina B 0,5 µg/ml) y se mantuvieron allí hasta su procesamiento.

Cada muestra de cartílago se colocó en una bandeja estéril y se troceó con un bisturí. El resultado de la operación se digirió mediante colagenasa (2 mg/ml, Sigma) disuelta en HAM-F12-Glutamax (Nutrient mixture HAM, Gibco Biochrom AG). La mezcla se incubó en agitación a 37^o C hasta que cada trozo estuvo completamente disuelto (entre 8 y 16 horas). Tras la digestión, el resultante estaba compuesto por condrocitos en suspensión. Se centrifugó la solución durante 10 minutos a 1400 rpm, y el sobrenadante obtenido se resuspendió de nuevo en 2-3ml de medio de cultivo.

Los condrocitos obtenidos se sembraron en monocapa en frascos de cultivo de 75 cm² a una concentración de entre 10000 a 15000 células por cm². Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a 37^oC y una concentración de oxígeno del 5%.

Elaboración de soporte proteico

Se procedió a fabricar soportes proteicos según lo descrito en el apartado 1 del Subestudio I.

Expansión celular, rediferenciación y sembrado de los soportes

Cuando los cultivos primarios alcanzaron confluencia, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células dos veces con suero salino tamponado con fosfato (PBS). Tras ello, se digirieron con tripsina/EDTA (T/E) (15 ml aproximadamente) y se incubaron a 37^o C hasta la disgregación

completa de las células. Una vez que los condrocitos estuvieron individualizados, se neutralizó la solución de T/E con la misma cantidad de medio de cultivo, y se centrifugó la mezcla a 1400 rpm durante 10 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo. SE contaron las células y se volvieron a sembrar en un frasco de cultivo a razón de 10000 a 15000 células por centímetro cuadrado. Se repitió esta maniobra de expansión celular cada vez que las células alcanzaban confluencia, durante tres o cuatro pases. Tras el proceso de expansión, las células se separaron del frasco de cultivo mediante digestión y se centrifugaron a 1400 rpm durante 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo de condrocitos, compuesto de HAM's F-12 (Biochrom AG) suplementado con 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma), 15% de suero humano (SH), 1% de L-glutamina (Biochrom AG, 200 mM) y 1% de solución antibiótica P/E (Biochrom AG, 10000 U/ 10000 µg/ml). Esta suspensión celular se sembró directamente sobre los soportes colocados en un frasco de cultivo. Se mantuvo el frasco con los soportes en agitación hasta el día siguiente en un incubador a 37° C y a una concentración de CO₂ del 5% para conseguir la penetración celular en los soportes. Al día siguiente, se extrajeron dos soportes del frasco de cultivo; uno se espolvoreó con oro y se examinó utilizando un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 6100, Tokyo, Japón) antes de la fase de rediferenciación, y el otro se incluyó en parafina, y cortó y tiñó con hematoxilina eosina, azul alcian y safranina para su examen histológico. El resto de los soportes se colocaron en una placa de seis pocillos de 35 mm de diámetro y se cubrieron con el medio de cultivo de condrocitos antes mencionado (aproximadamente 5 ml por pocillo). Se mantuvieron en cultivo de esta manera, cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días.

Identificación de cultivos

Tras el final de la expansión, se tomaron 100.000 células de un frasco de cultivo y se suspendieron en 3 ml de solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5%. Esta solución con células se sembró en una Placa de Petri de 35 mm de diámetro que contenía el siguiente medio de cultivo: HAM-F12, 10% de suero bovino fetal, y ácido ascórbico (50µg/mL)(Sigma). Tras 21 días de cultivo, la agarosa fue fijada en formalina al 10% y se realizaron tinciones de azul alcian, safranina y colágeno tipo II para determinar la estirpe celular de los cultivos.

Marcaje con GFP

Aproximadamente 600.000 condrocitos fueron disgregados y separados de un frasco de cultivo, se colocaron en una placa de seis pocillos en una concentración de 100.000 condrocitos en cada pocillo y se infectaron mediante un retrovirus derivado de un virus de leucemia murina portador del gen de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) producido en una línea celular de empaquetado PA317. Tras la inoculación, los pellets fueron centrifugados a 2000 rpm para favorecer la mezcla.

Seis horas después, el sobrenadante sobrante fue retirado y sustituido por medio de cultivo de condrocitos y se mantuvo así hasta el día siguiente. Se repitió la misma operación al día siguiente para conseguir una mayor tasa de infección. Tras ello, se sembró el contenido de cada pocillo en un frasco de cultivo de 75 cm². Se comprobó la tasa de infección por examen histológico y por visión directa bajo el microscopio de inmunofluorescencia, oscilando entre el 85 y el 90% de la población celular. Se seleccionó el frasco de cultivo con el porcentaje de infección más alto, y sus condrocitos se sembraron sobre un soporte para conseguir el marcaje experimental.

Formación de cartílago in vitro.

Para comprobar la formación de cartílago in vitro, tres soportes sembrados con condrocitos expandidos se mantuvieron en proceso de rediferenciación durante tres meses. En ese momento, se seleccionó un soporte y se procesó para su estudio mediante microscopía electrónica de barrido, según lo anteriormente mencionado. Los otros dos soportes fueron incluidos en parafina y procesados para su examen histológico tiñéndolos con hematoxilina eosina, colágeno II, azul alcian y rojo de safranina.

Subestudio III. Injerto de los cultivos celulares sobre soportes tridimensionales en el dorso de ratones atímicos.

1. *Estudiar el comportamiento histológico de los cultivos obtenidos tras su aplicación como injerto libre subcutáneos en el dorso de ratones atímicos (Foxn1nu/Foxn1nu), sacrificados tras 60 días de la cirugía.*

Formación de cartílago in vivo: trasplante subcutáneo a ratón atímico

Para comprobar la formación de cartílago in vivo, un scaffold sembrado con condrocitos se mantuvo en rediferenciación durante tres semanas. Posteriormente se implantó subcutáneamente en el dorso de un ratón atímico *Foxn1nu/Foxn1nu*. Se cerró la herida quirúrgica mediante puntos sueltos de sutura trenzada y recubierta de polímeros de ácido poliglicólico (Safil; B.Braun/Melsungen, Alemania). Se mantuvo al animal bajo los cuidados habituales según el protocolo del Bioterio, y el postoperatorio transcurrió sin incidencias. No se observaron infecciones ni dehiscencias de la herida quirúrgica. Tras dos meses, se sacrificó al animal mediante inhalación de CO₂. Inmediatamente tras el sacrificio, se extrajo el scaffold, se sumergió en suero salino para su transporte y se llevó de nuevo al laboratorio. La muestra obtenida fue fijada en parafina y tallada y teñida con hematoxilina-eosina, colágeno II y safranina para su estudio histológico.

Subestudio IV. Injerto de los cultivos celulares sobre soportes tridimensionales en defectos auriculares de conejos de Nueva Zelanda

1. *Estudiar el comportamiento histológico e inmunohistoquímico de las muestras obtenidos tras su aplicación como injertos libres para reparar defectos auriculares de conejos sacrificados a los 120 días del injerto.*

Reparación de cartílago in vivo: reparación de defectos en orejas de conejo de Nueva Zelanda

Para este trabajo, se utilizaron cinco conejos de Nueva Zelanda de un peso aproximado de 2,5 kg. En cada intervención, se anestesió al animal mediante los fármacos y técnicas descritos previamente, incluidos en el protocolo del Bioterio de la Universidad de Oviedo.

En una primera intervención, se obtuvo una biopsia de cartílago auricular de aproximadamente 1cm² de cada animal bajo anestesia. Se procesó la muestra de la manera mencionada anteriormente (ver *obtención de células*). Tras la expansión y tres semanas de rediferenciación sobre scaffold, se llevó de nuevo a cada animal al quirófano. Bajo anestesia, se realizaron dos defectos circulares de 5 mm de diámetro en una oreja (la no biopsiada previamente) del animal. En uno de los defectos se introdujo un soporte sin células para servir de control. En el otro se introdujo un scaffold con condrocitos autólogos rediferenciados. Las heridas se cerraron cuidadosamente con puntos sueltos. Los cuidados postoperatorios se realizaron según el protocolo del Bioterio, sin incidencias. En uno de los sujetos se implantó un scaffold sembrado con condrocitos autólogos marcados con GFP, como se detallaba en la sección *Marcaje con GFP* del subestudio II.

Tras cuatro meses, los animales fueron sacrificados por medio de inyección letal. Se incidió la piel de la oreja intervenida longitudinalmente, y los sitios de implante se documentaron fotográficamente y se extrajeron en bloque. Las muestras se transportaron en suero salino hasta su inclusión en paraformaldehído. Tras su inclusión, las muestras se cortaron y tiñeron con Hematoxilina-Eosina, azul alcán, colágeno II, safranina y elastina. Las muestras marcadas con GFP se observaron bajo un microscopio confocal y se tiñeron con una inmunoglobulina antiGFP para su identificación posterior.

Resultados

Subestudio I. Medición de características físicas y biocinéticas del soporte

1. *Elaboración de soportes tridimensionales a partir de la fracción proteica de sangre venosa.*
2. *Evaluación de dichos soportes mediante microscopía electrónica de barrido y biorreómetro para obtener los parámetros estructurales que lo definan.*
3. *Implante subcutáneo en animal inmunocompetente (conejo de Nueva Zelanda) de varios soportes, y explante mensual, con documentación de los cambios morfológicos de volumen y peso, para objetivar la velocidad de degradación del mismo y evaluar mediante el estudio histológico de las muestras su método de degradación.*

Elaboración de soportes

El proceso de elaboración de soportes produjo cilindros de un material esponjiforme de color marrónáceo, suaves y deformables al tacto y de estructura macroscópica porosa. (Fig)**FOTO 3**

Características del scaffold

Estructura microscópica

La estructura microscópica del soporte celular de albúmina fue examinada mediante el microscopio electrónico de barrido. El tamaño de poro variaba entre 150 y 300 μm en los cortes transversales y entre 300 y 500 μm en los longitudinales (figs. 4 y 5). La estructura presentaba poros de tamaño irregular y disposición en capas superpuestas. Prácticamente todos los poros estaban interconectados.

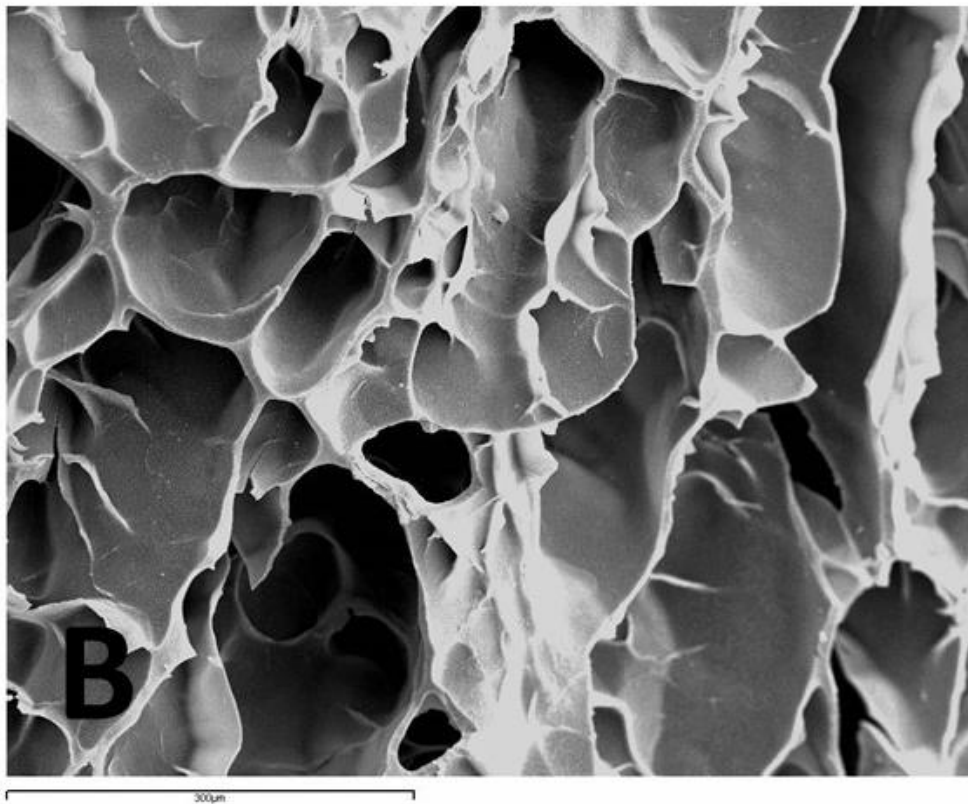
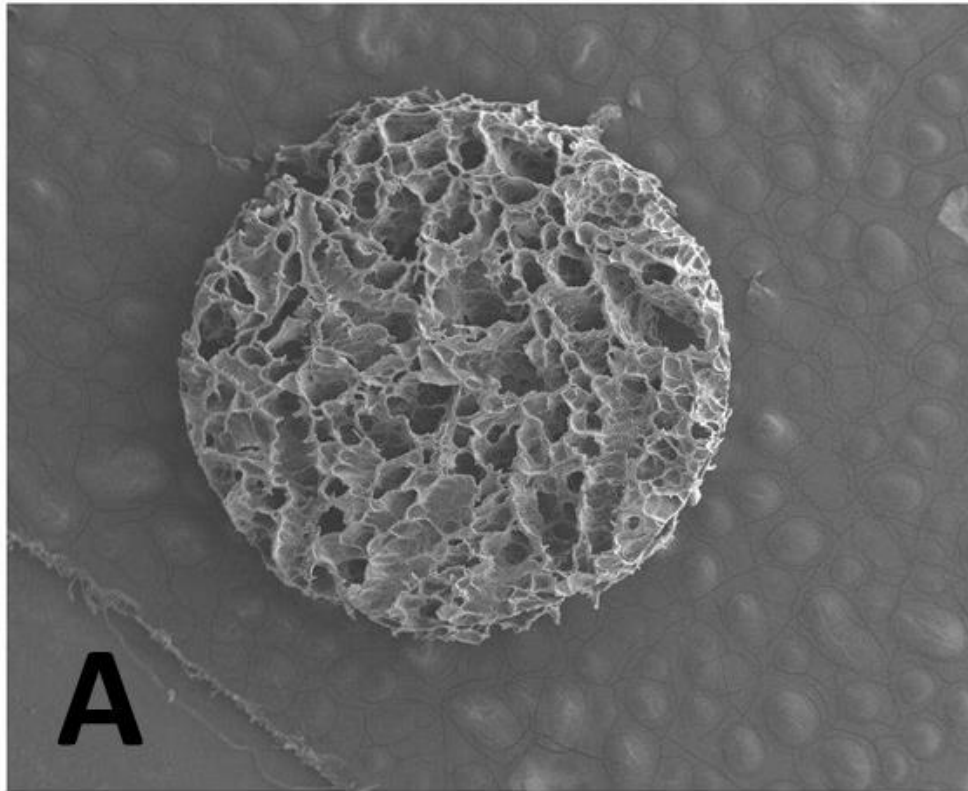


Figura 4: A vista bajo el microscopio electrónico de barrido de un soporte, escala 2mm. B Microestructura del soporte con poros interconectados, escala 300µm.

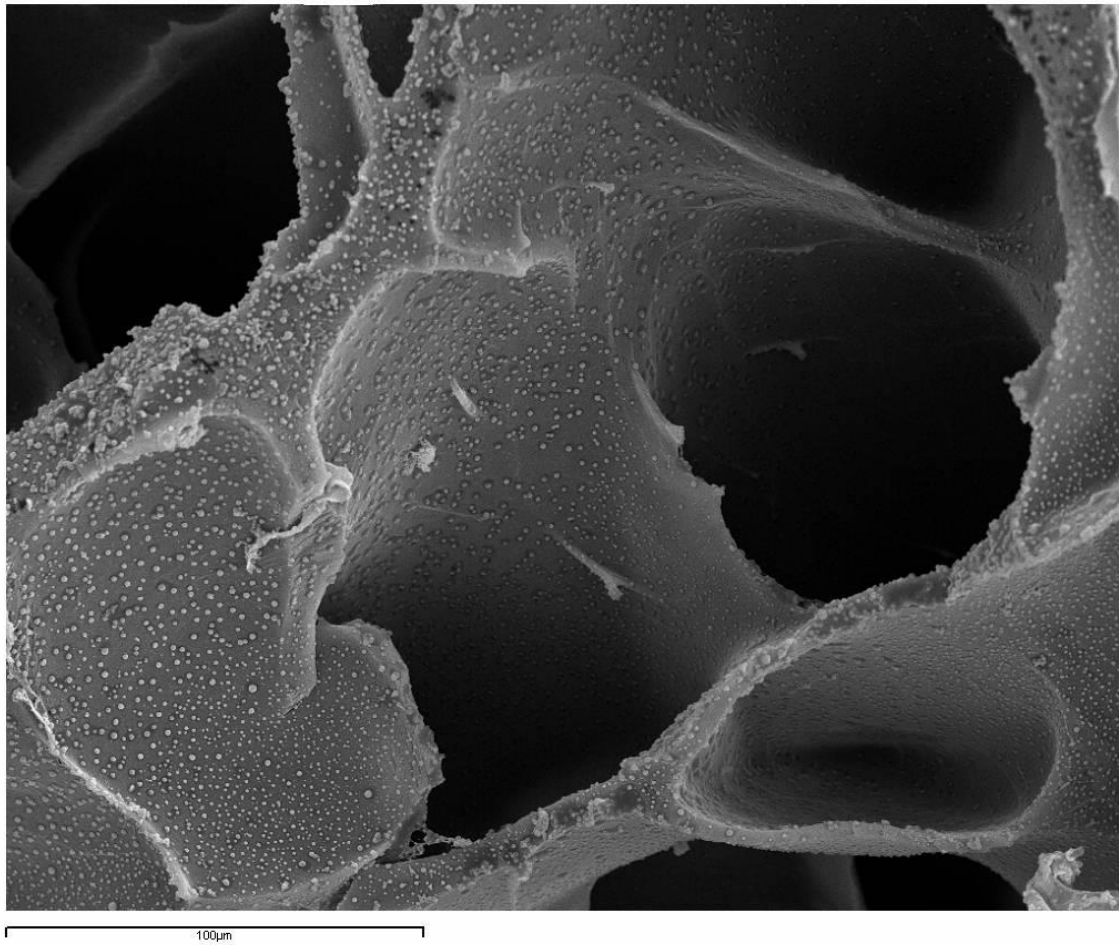


Figura 5. Superficie del soporte. Escala 100 μm

Características mecánicas

Se define la sigma crítica (σ_c) como el mayor valor de tensión antes de la deformación definitiva. Este parámetro se determinó midiendo la tensión en el punto de mayor pendiente en la porción más lineal de la curva (región viscoelástica lineal) (figura 6). Para el soporte proteico experimental, σ_c fue de 22 Pascales (Pa). Medimos el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G''). En todas nuestras muestras, $G' > G''$ indicando que el soporte tiene un comportamiento más elástico que viscoso.

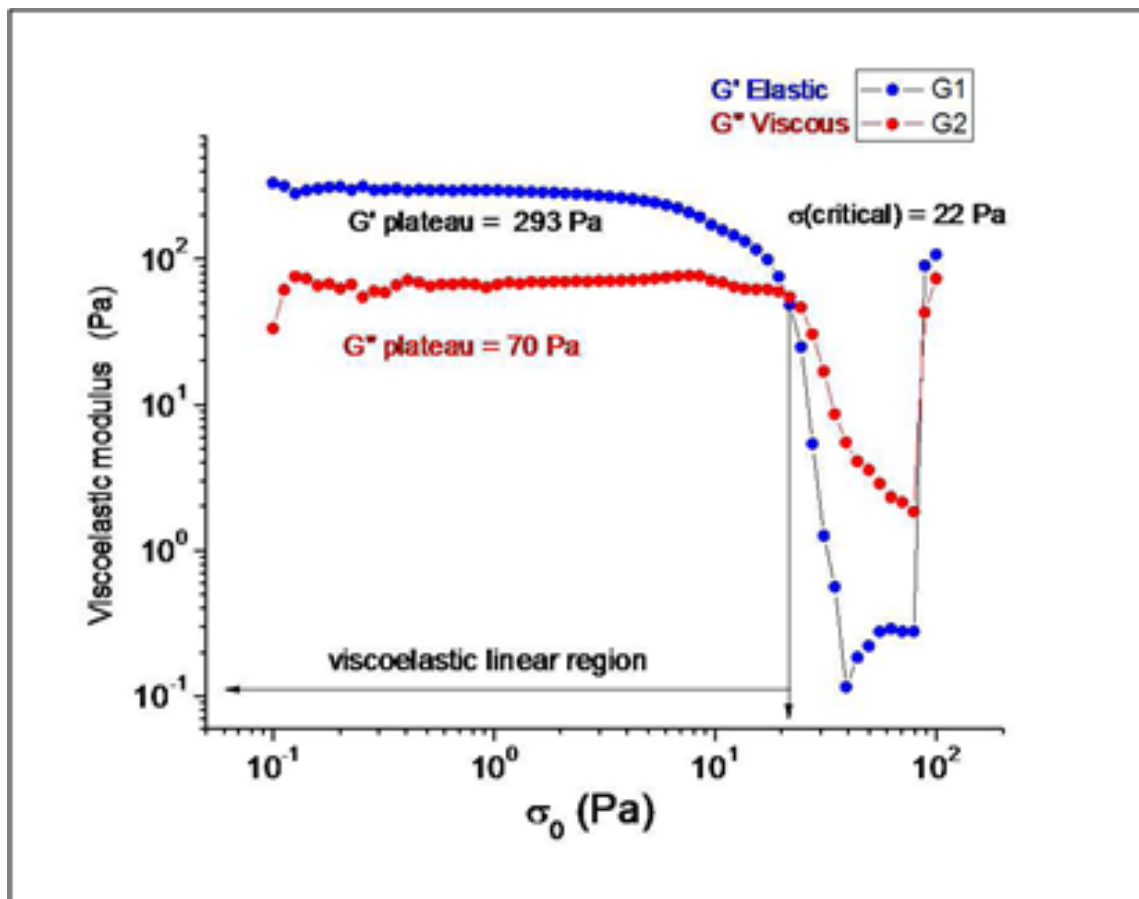


Figura 6. Gráfico de deformación obtenido con el biorreómetro. Se observa que el módulo elástico es mayor que el viscoso, indicando un comportamiento más elástico que viscoso del soporte. Reproducido con permiso de Gallego L. et al. 2010. Repair of rat mandibular bone defects by alveolar osteoblasts in a novel plasma-derived albumin scaffold. Tissue Eng. Part A 16, 1179–1187.

Comportamiento del soporte in vivo y vida media de degradación

Las fotografías obtenidas de cada implante se muestran en las figuras 7, 9, 11 y 14, y sus pesos están recogidos en la tabla 2. Se observa un aumento inicial del peso del implante motivado por la invasión de tejido neoformado seguida por una rápida pérdida de volumen. El peso de la muestra del cuarto mes no llega a 0 aunque casi no se objetivan restos de soporte por dos motivos: uno, la presencia del hemoclip con su peso constante no sujeto a degradación. Dos, la presencia de tejido neoformado incluido en la biopsia en bloque.

Su examen microscópico muestra cómo la estructura está inicialmente inalterada durante el primer mes, pero se va degradando hasta casi desaparecer en el cuarto mes. Junto con esta desaparición del soporte se produce una invasión de tejido nativo en los poros del soporte, sin observarse infiltrados inflamatorios asociados al soporte. Sí que se observan células gigantes multinucleadas adheridas al soporte, sugiriendo un papel importante de este tipo celular en la degradación del soporte.

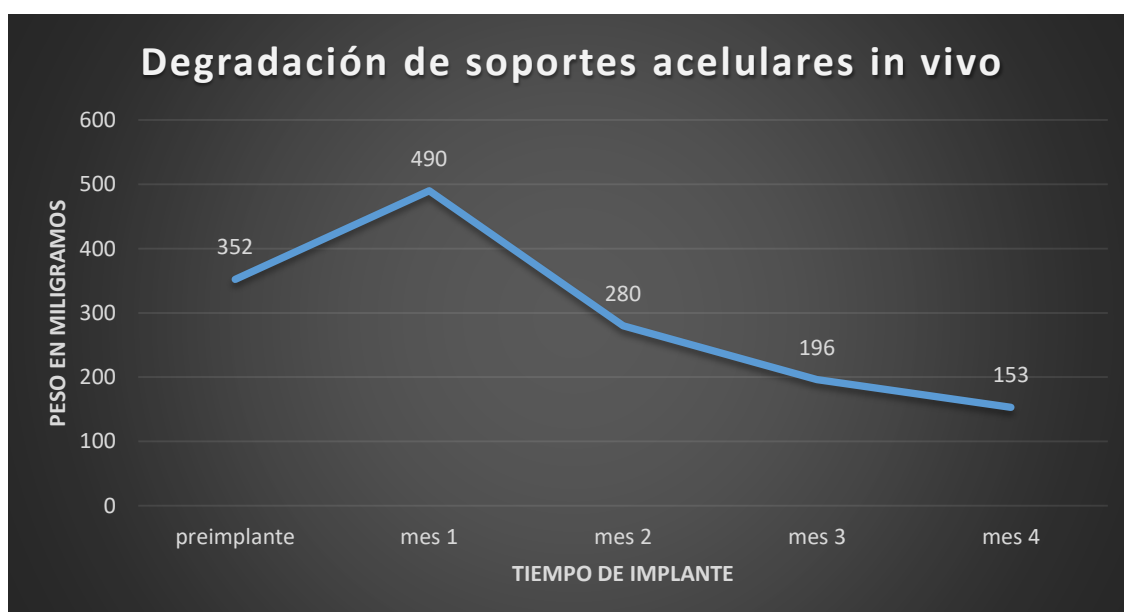


Tabla 2. Evolución de los pesos de los soportes acelulares implantados en el dorso de conejos de Nueva Zelanda.

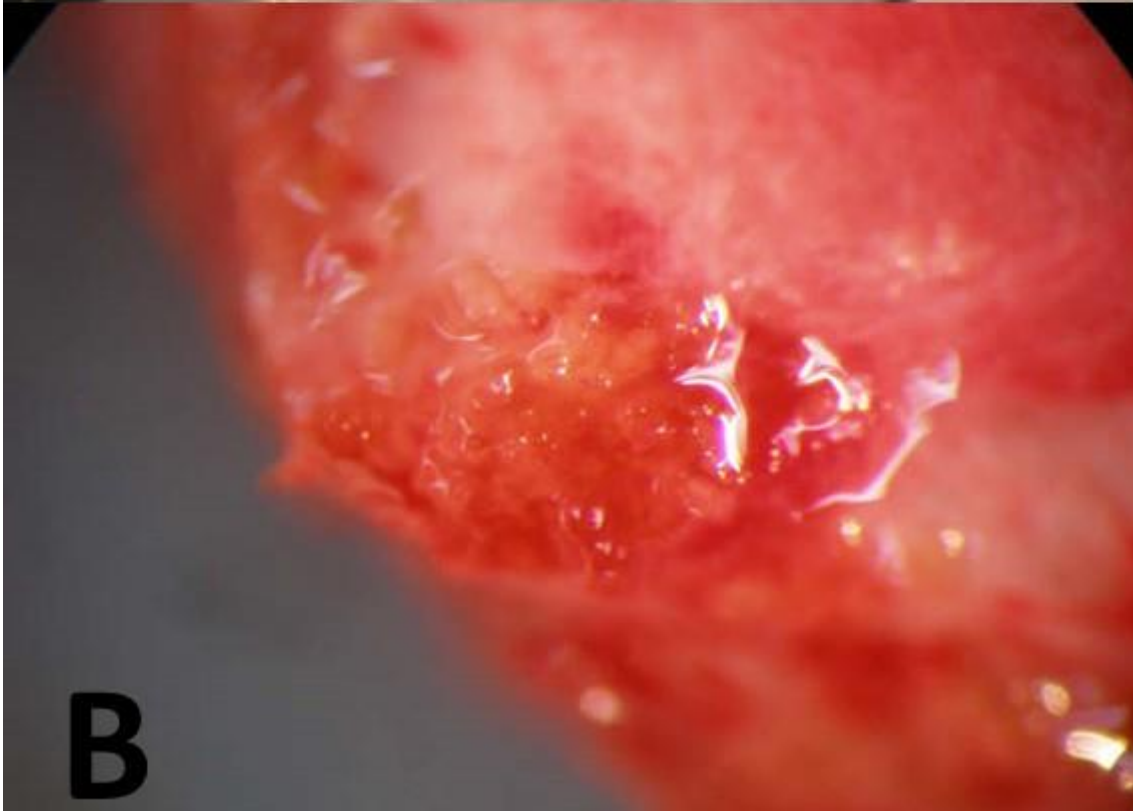
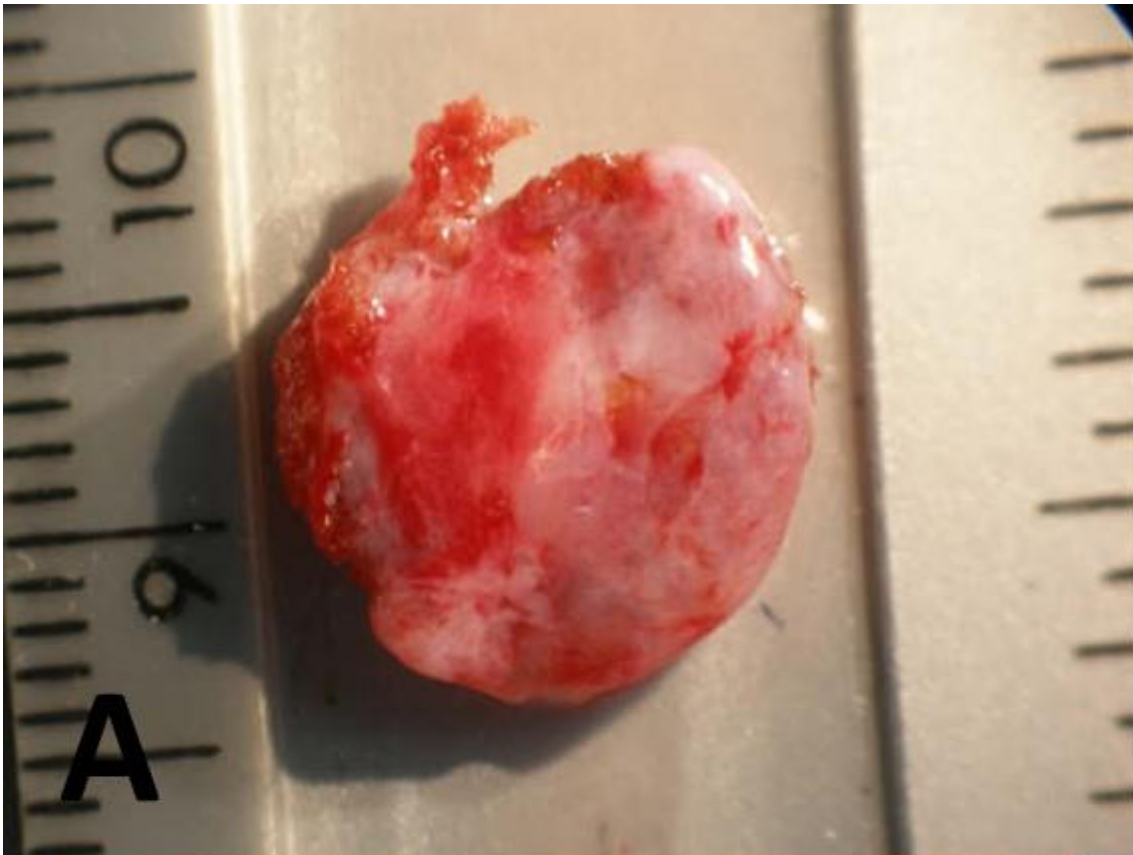


Figura 7.A, visión macroscópica del soporte acelular extraído al mes de su implante; B, detalle mediante magnificación con lupa donde se aprecia la invasión del soporte por tejido nativo.

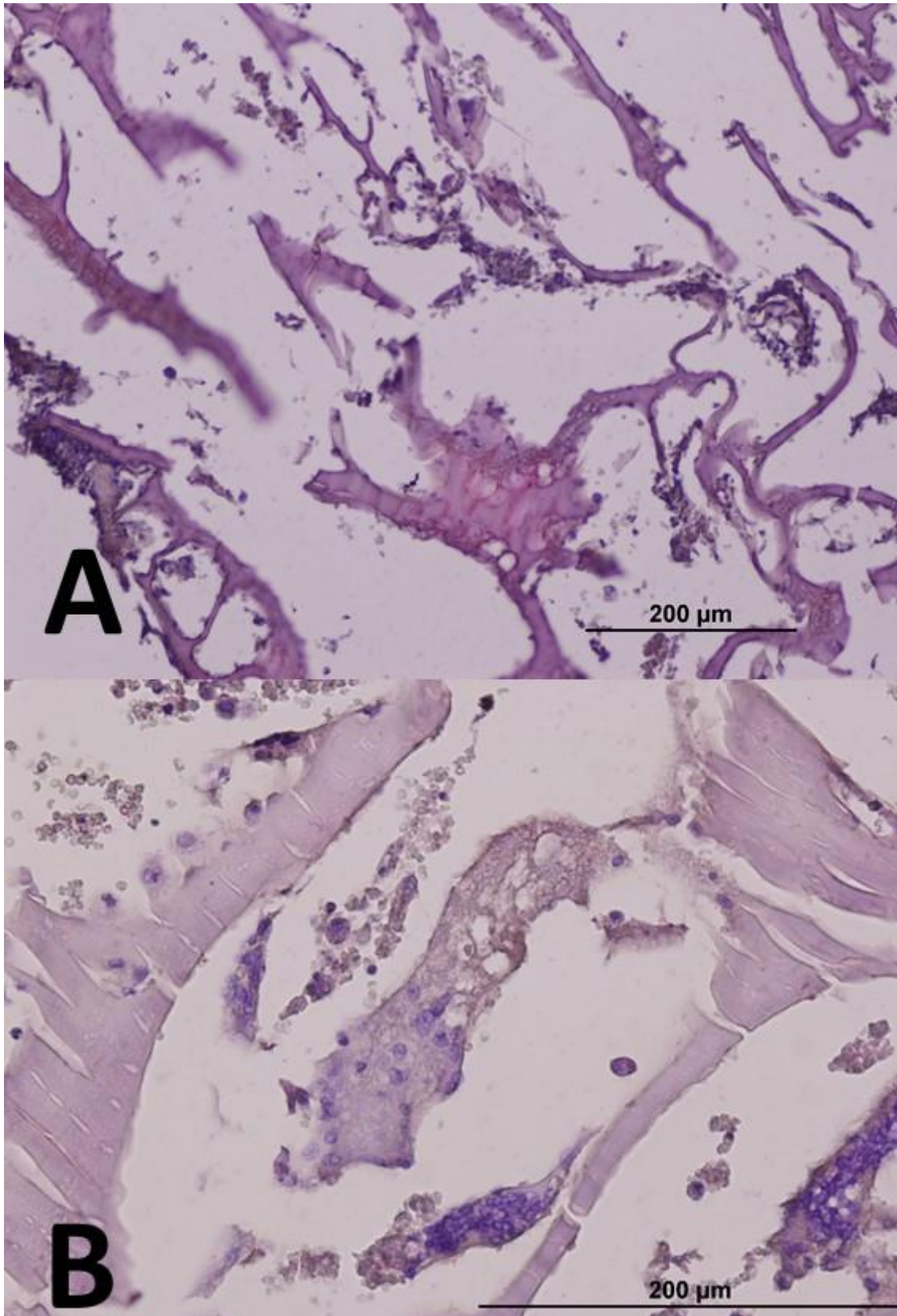


Figura 8. Visión microscópica de la extracción del primer mes. A, Integridad del soporte e invasión de tejido nativo incipiente. B, detalle del tejido junto al scaffold. Hematoxilina-Eosina.

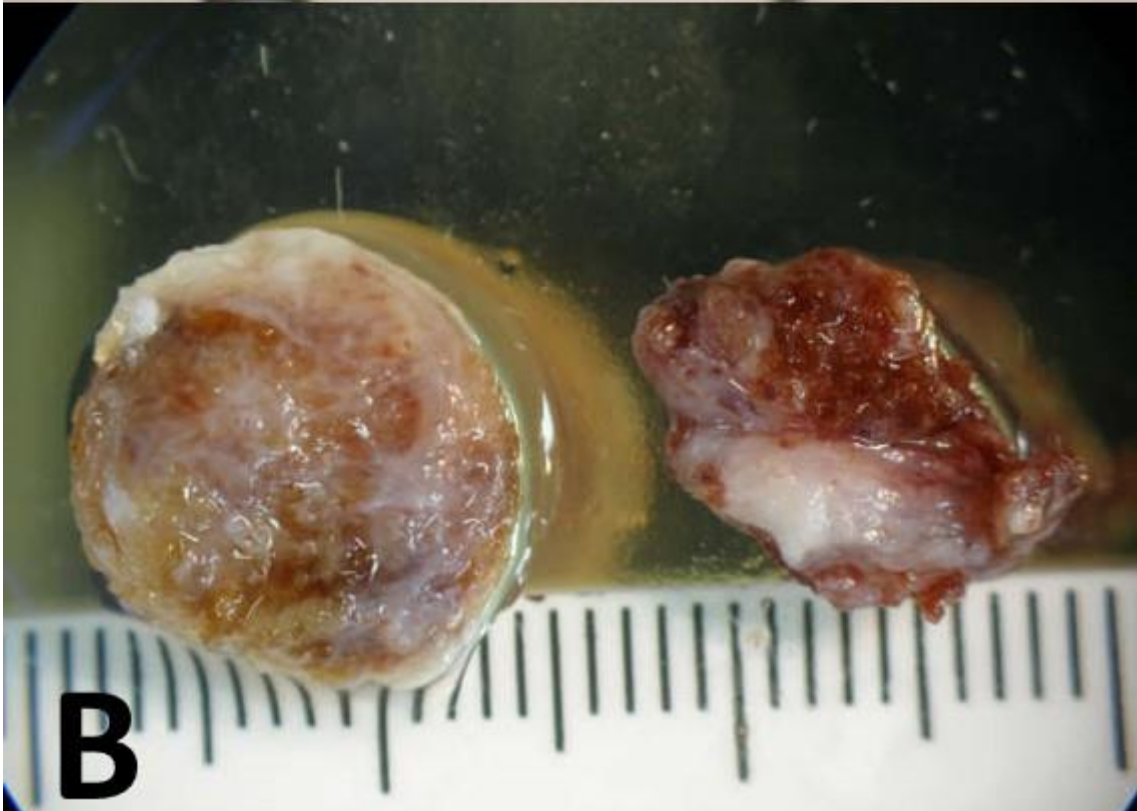
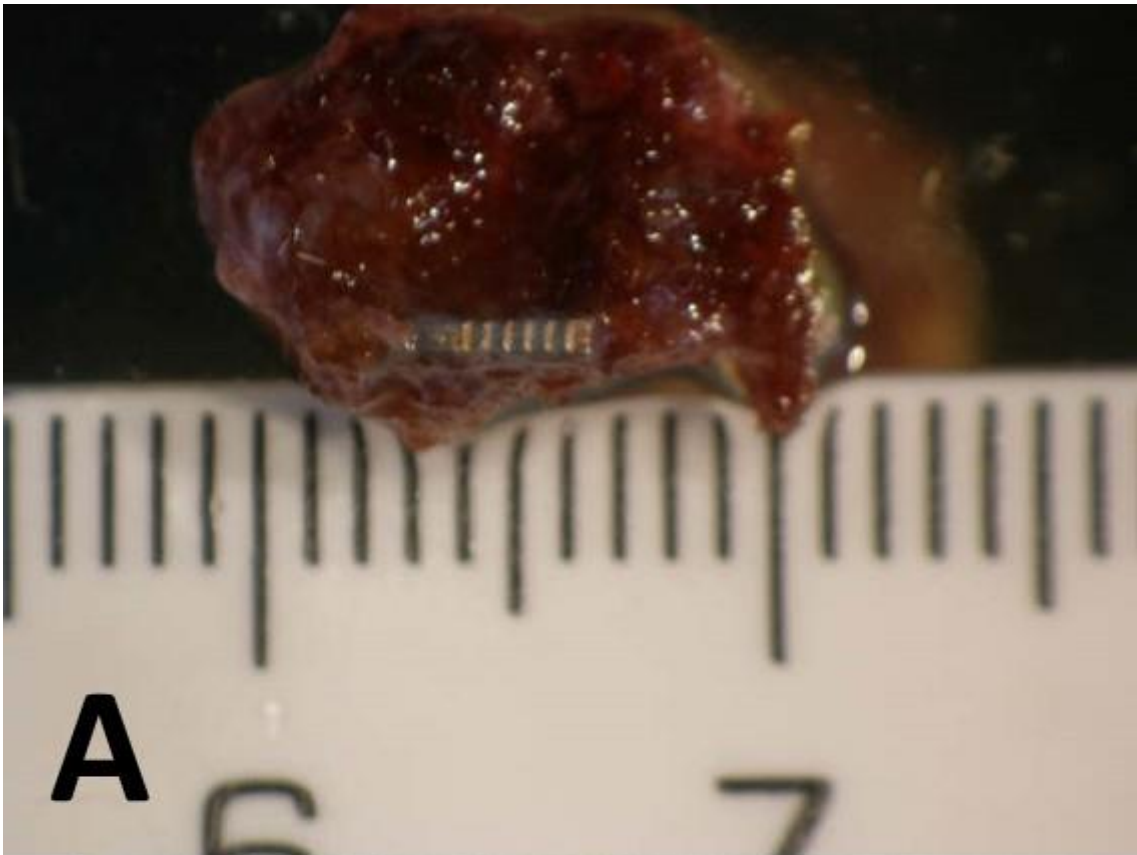


Figura 9. A, soporte acelular extraído a los dos meses del implante; B, comparación macroscópica entre el explante del primer y del segundo mes.

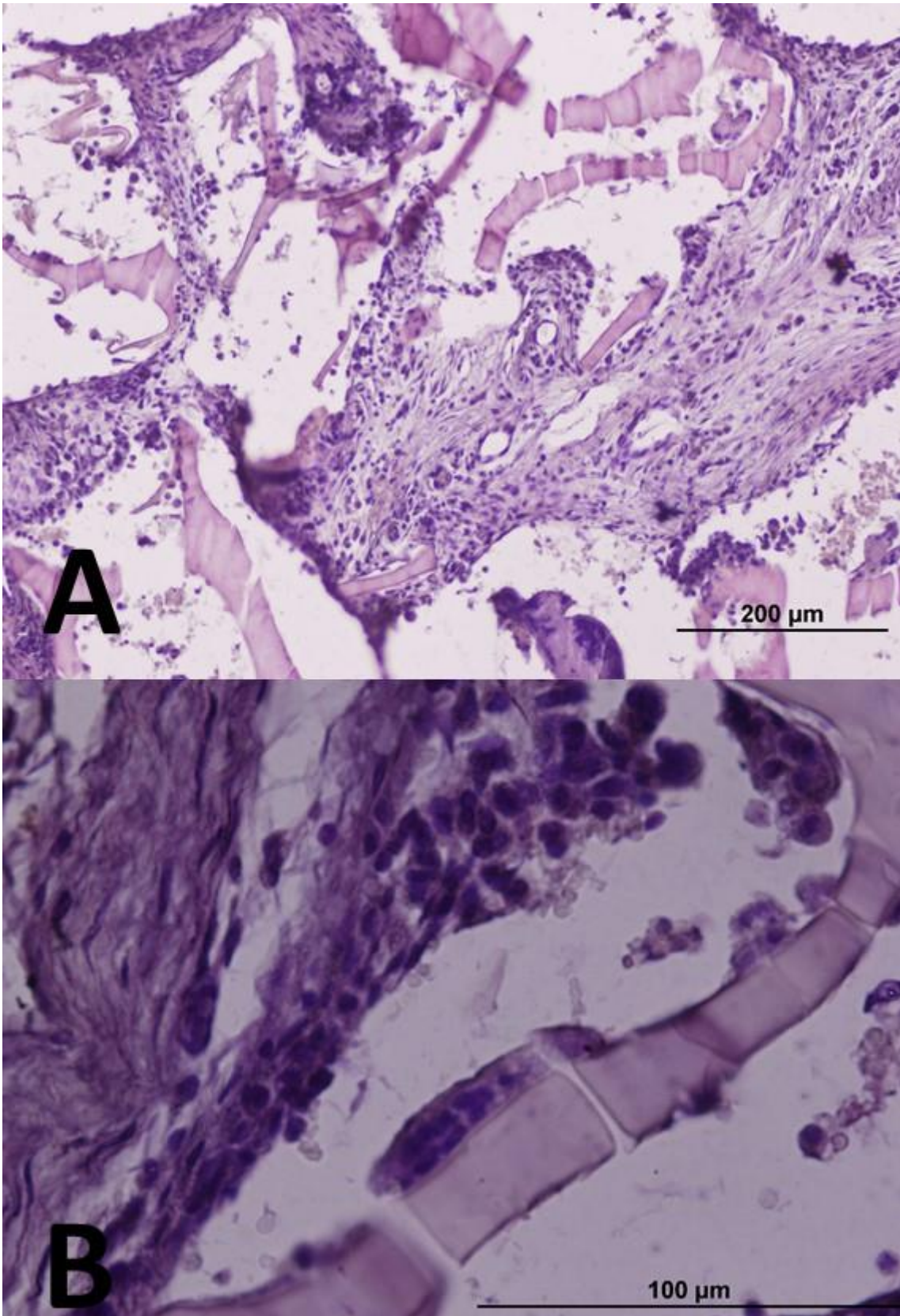


Figura 10. Visión microscópica de la extracción del segundo mes. A, aumento de la celularidad en los poros del soporte. B, células gigantes adheridas al soporte. Hematoxilina-eosina

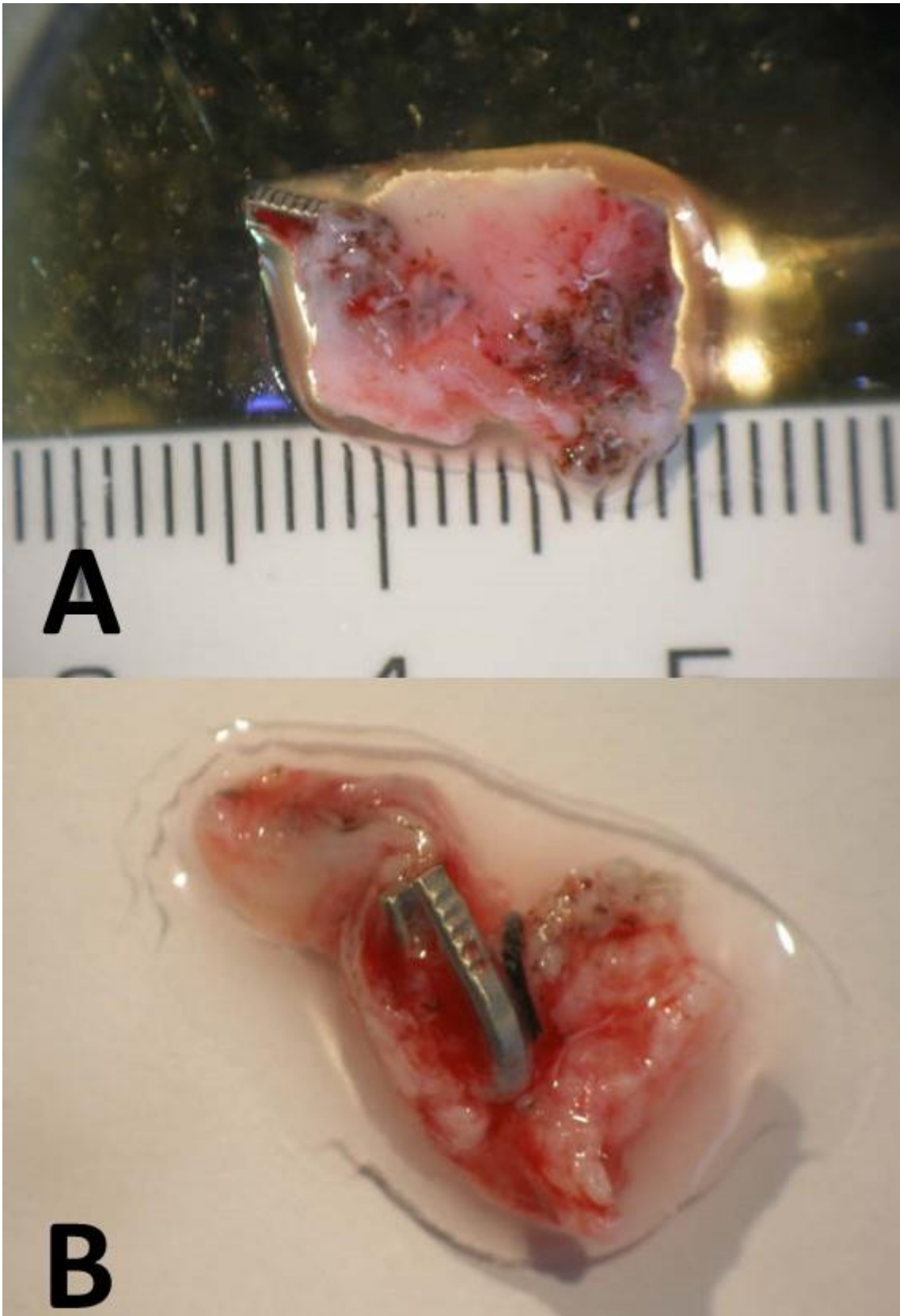


Figura 11. A, imagen macroscópica del soporte acelular extraído a los tres meses del implante; B, soporte extraído a los cuatro meses.

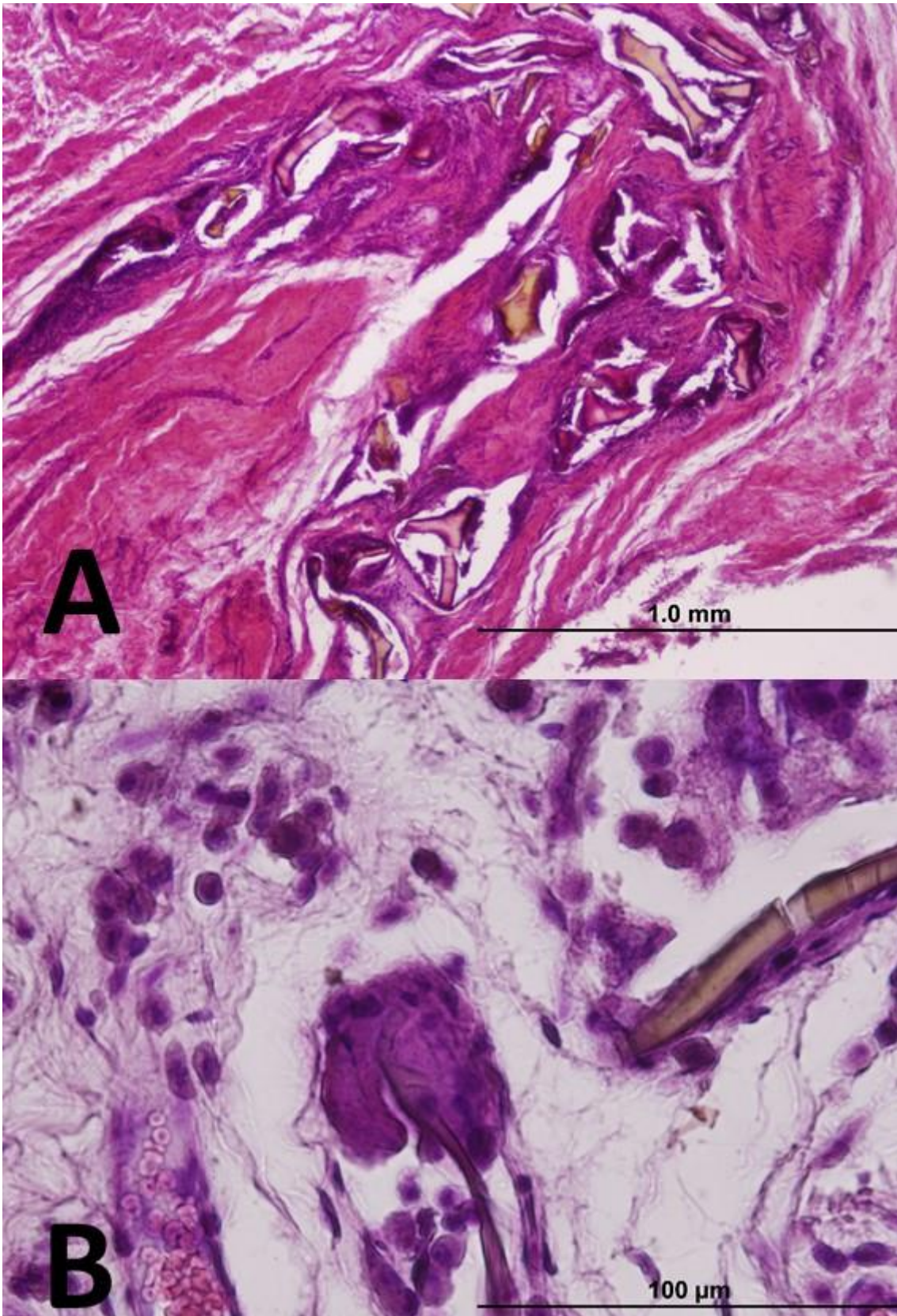


Figura 12. Extracción del implante acelular del tercer mes. A, aumento de la celularidad y disrupción del soporte. B, detalle de la fagocitosis. Hematoxilina-eosina.

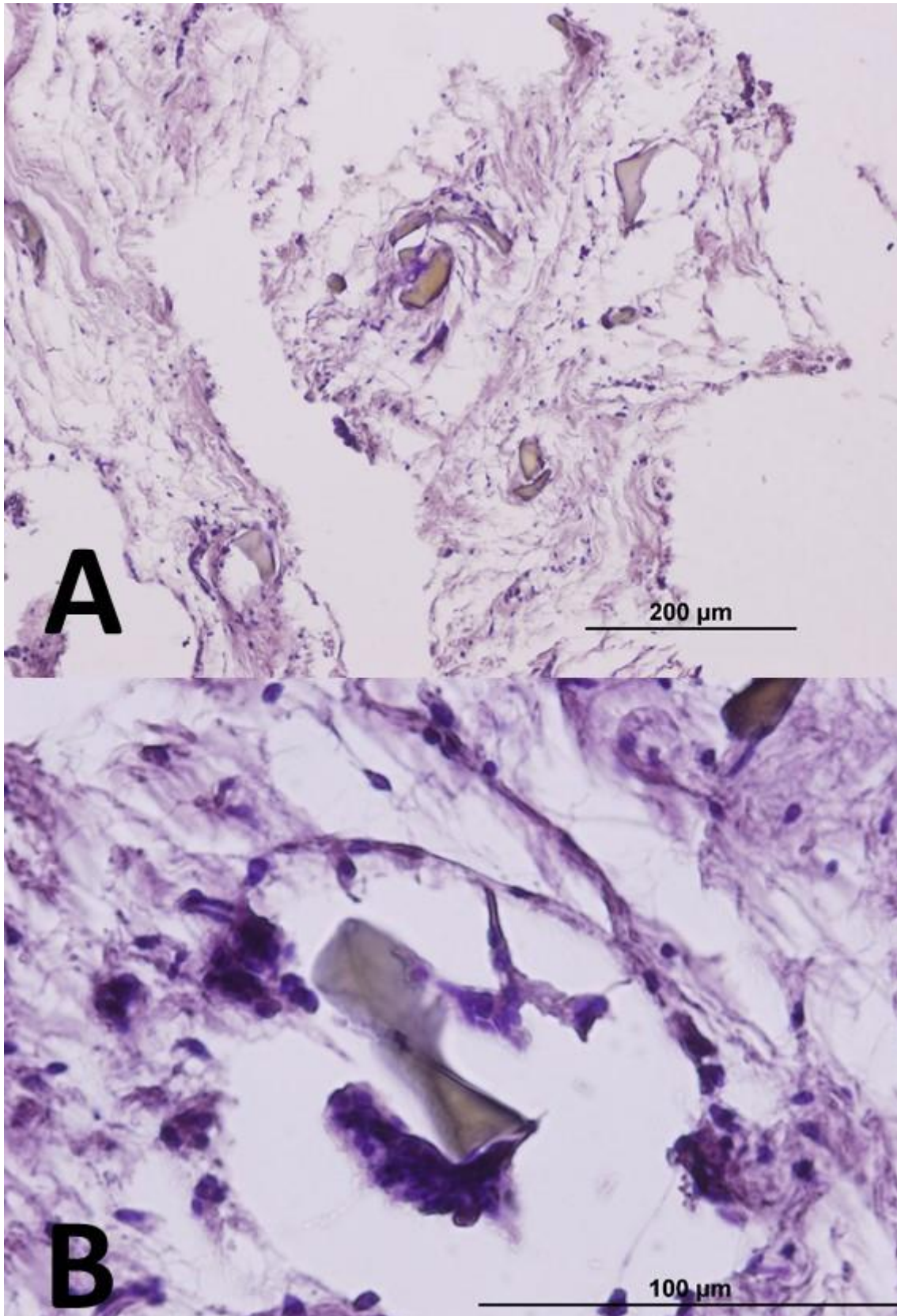


Figura 13. Extracción de implante acelular, cuarto mes. A, desaparición casi completa del soporte. B, detalle. Hematoxilina-eosina.

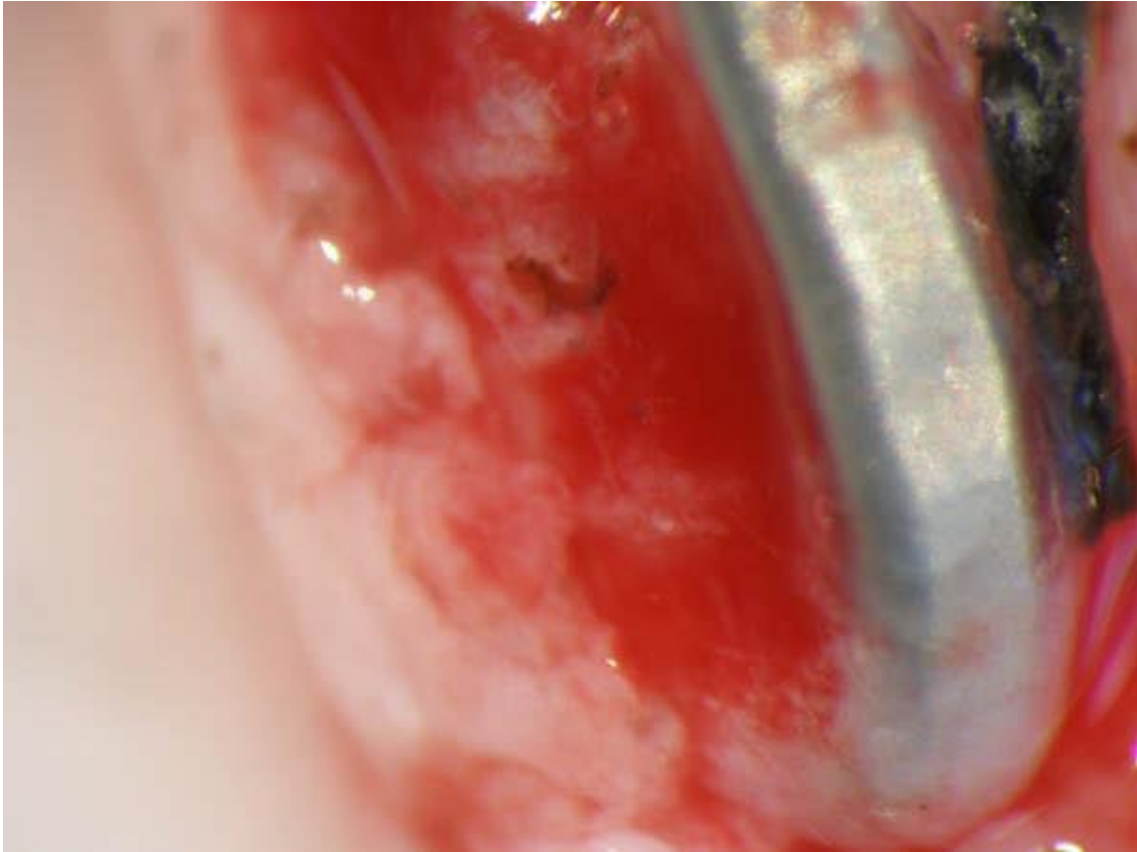


Figura 14. Detalle del explante del cuarto mes bajo magnificación con lupa. Nótese la práctica ausencia de soporte, estando la pieza compuesta por tejido conectivo.

Subestudio II. Cultivo in vitro de condrocitos de origen auricular.

Formación de cartílago in vitro.

El estudio histológico de los soportes sembrados con condrocitos indiferenciados (tras la expansión en monocapa) mostraba células fusiformes parecidas a fibroblastos, sin objetivarse producción de matriz extracelular (figura 15). Estas células eran negativas para la tinción de azul alción. La imagen al microscopio electrónico de barrido mostraba células fusiformes adheridas al soporte.

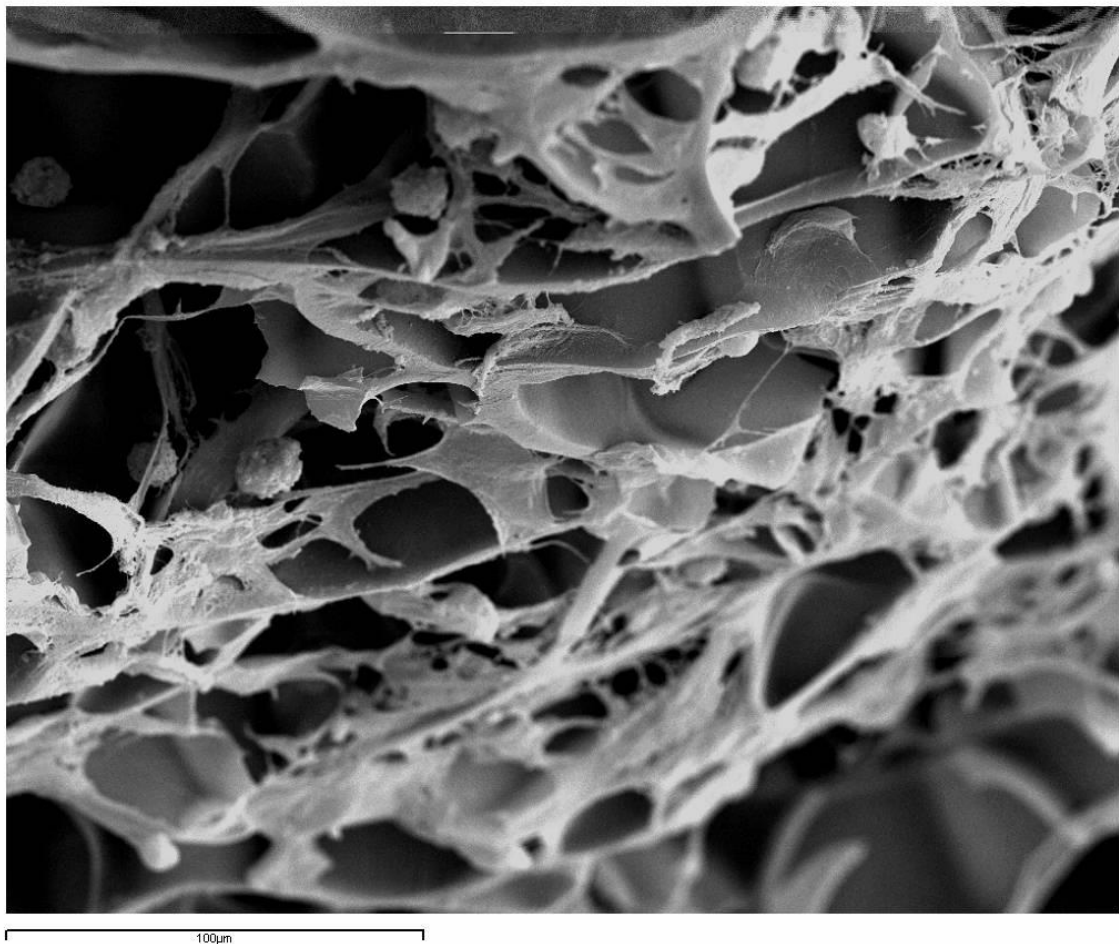


Figura 15. Imagen de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de soporte sembrado con condrocitos tras la fase de expansión. Nótese la forma alargada de las células. Escala 100 μ m

Tras la fase de rediferenciación, las células presentaban una forma más redondeada a través del microscopio de contraste de fases. Estas células se teñían con azul alción (figura 16). Al

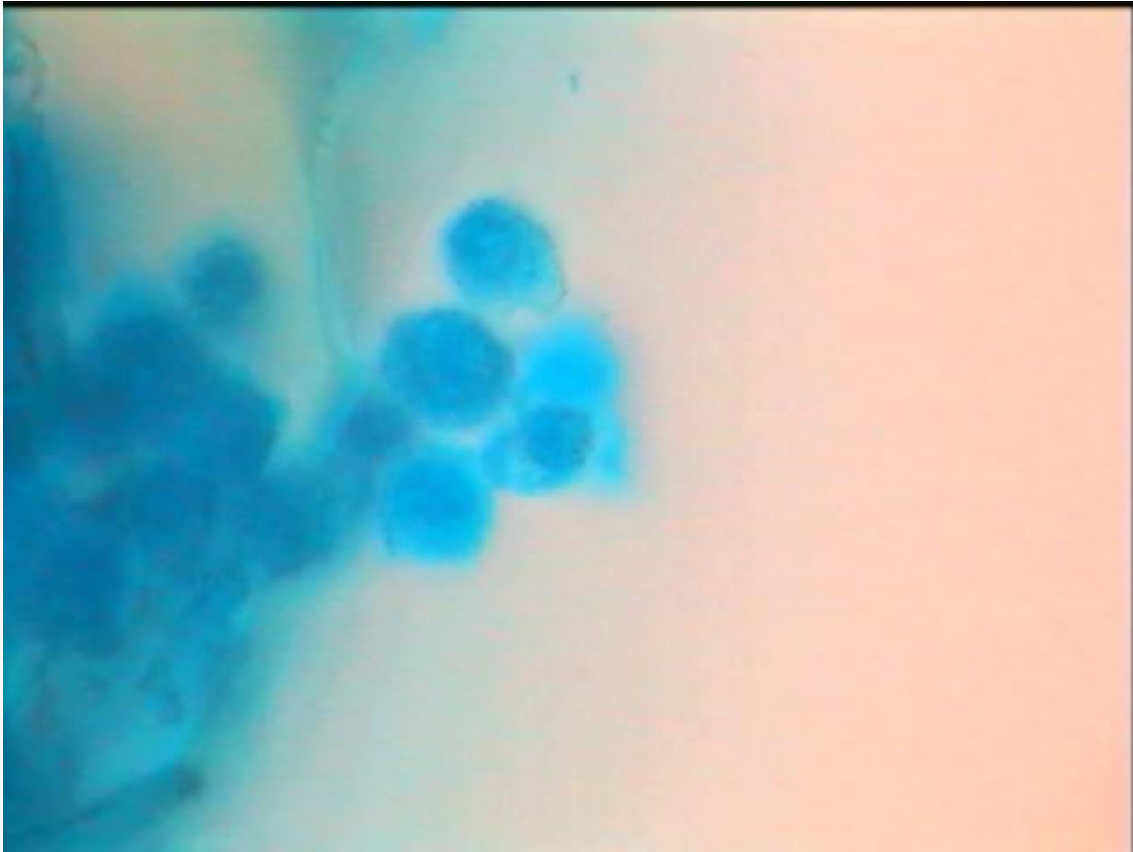


Figura 16. Imagen de microscopio de contraste de fases mostrando condrocitos tras la fase de rediferenciación, de forma más redondeada y teñidos con azul alción.

microscopio electrónico de barrido, se objetivaba un buen número de células redondas en los poros adheridas al scaffold (figura 17). Estas células presentaban características morfológicas coincidentes con las de los condrocitos maduros. No se objetivó matriz extracelular en los estudios de imagen o en los histológicos. Las muestras fueron negativas para las tinciones de colágeno II y safranina.

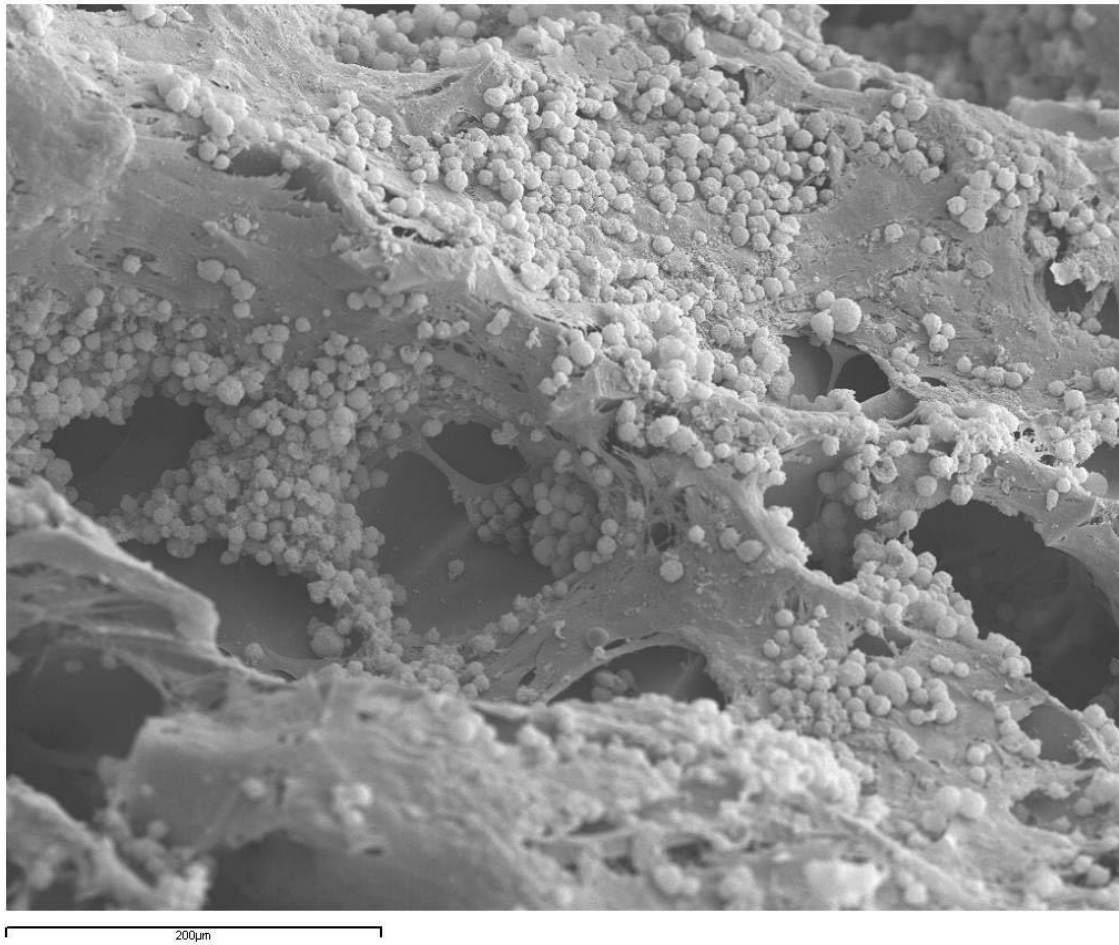


Figura 17. Imagen de MEB mostrando condrocitos tras tres meses de rediferenciación. Nótese la forma redondeada de las células y la ausencia de matriz extracelular. Escala 200 μ m

Subestudio III. Injerto de los cultivos celulares sobre soportes tridimensionales en el dorso de ratones atímicos Fox1nu/Fox1nu.

Formación de cartílago in vivo: trasplante ectópico subcutáneo en ratón atímico.

El estudio histológico del implante subcutáneo mostraba tejido cartilaginoso maduro creciendo dentro de los poros del soporte (fig. 18-19). La matriz extracelular en la que estaban embebidos los condrocitos era positiva para las tinciones de colágeno II (fig.20 y 21) y safranina (fig. 22 y 23), confirmando la presencia de fibras de colágeno II y glucosaminglicanos en la matriz. La estructura del scaffold permanecía inalterada tras dos meses de implante subcutáneo. No se objetivó formación de hueso en el tejido neoformado.

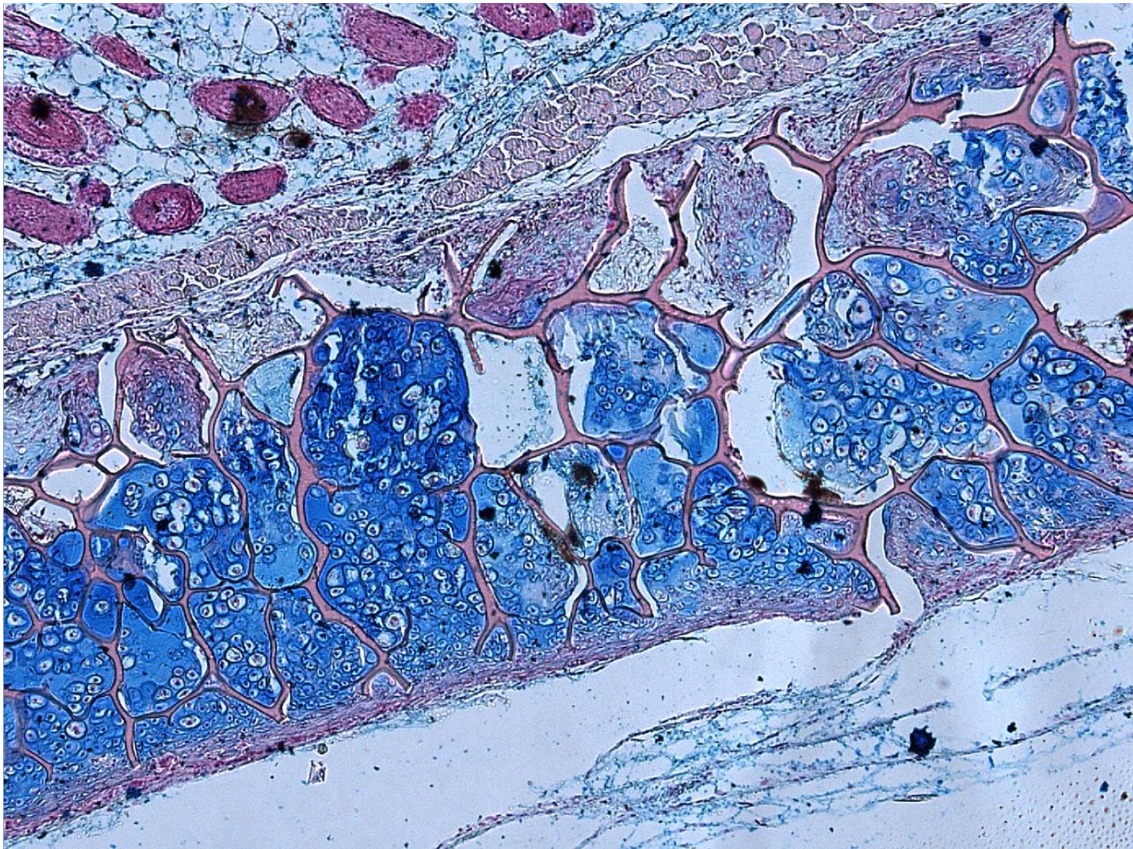


Figura 18. Imagen del soporte celular en dorso de ratón atímico a los dos meses de implantación. Se observa tejido cartilaginoso con matriz extracelular en los poros del implante. Hematoxilina-Eosina, 5x.

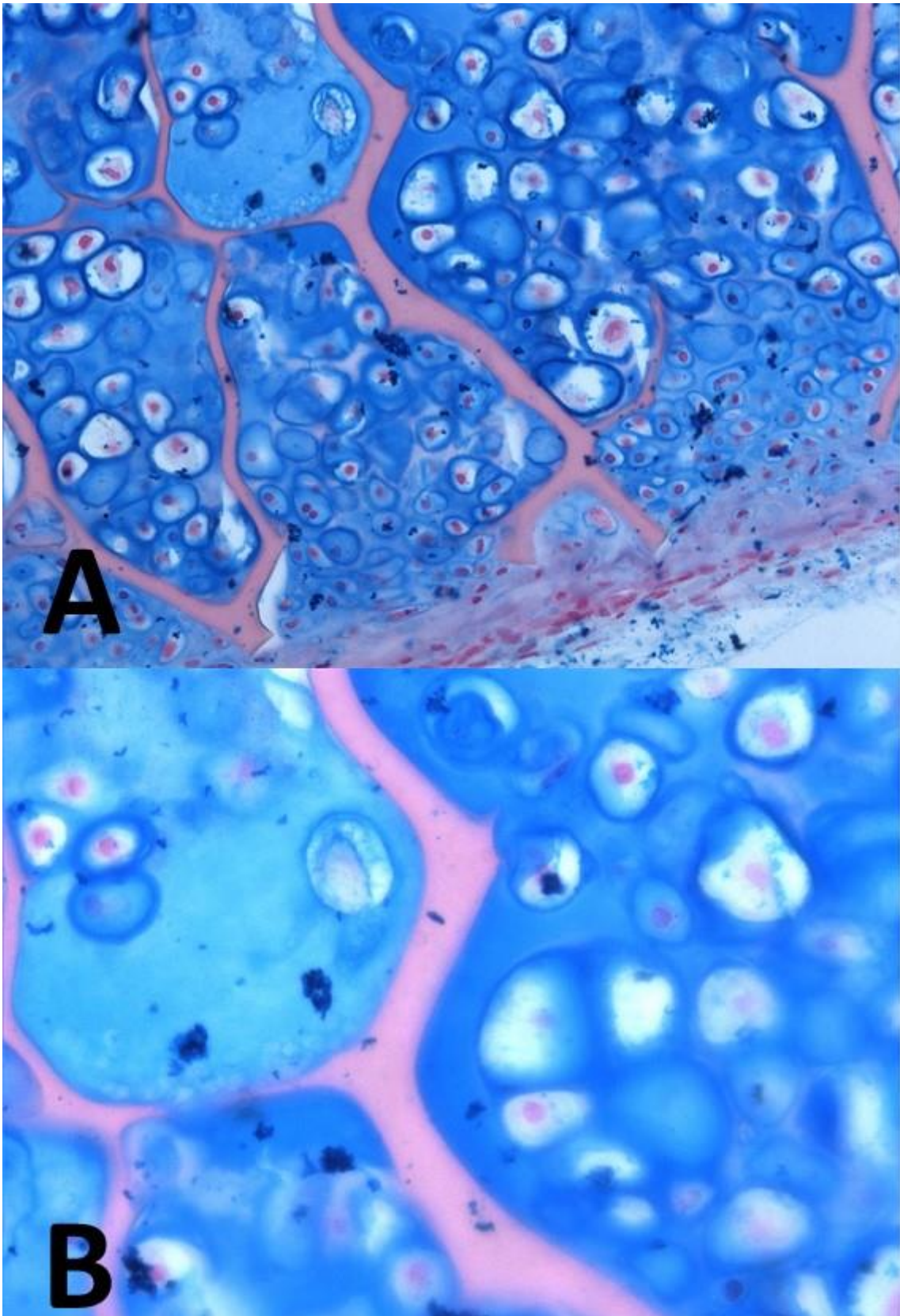


Figura 19. A, Detalle del soporte previo mostrando una relación normal entre células y matriz extracelular. Hematoxilina-Eosina, 20x; B, persistencia del soporte a los dos meses de implante con tejido cartilaginoso llenando los poros, HE, 40x.

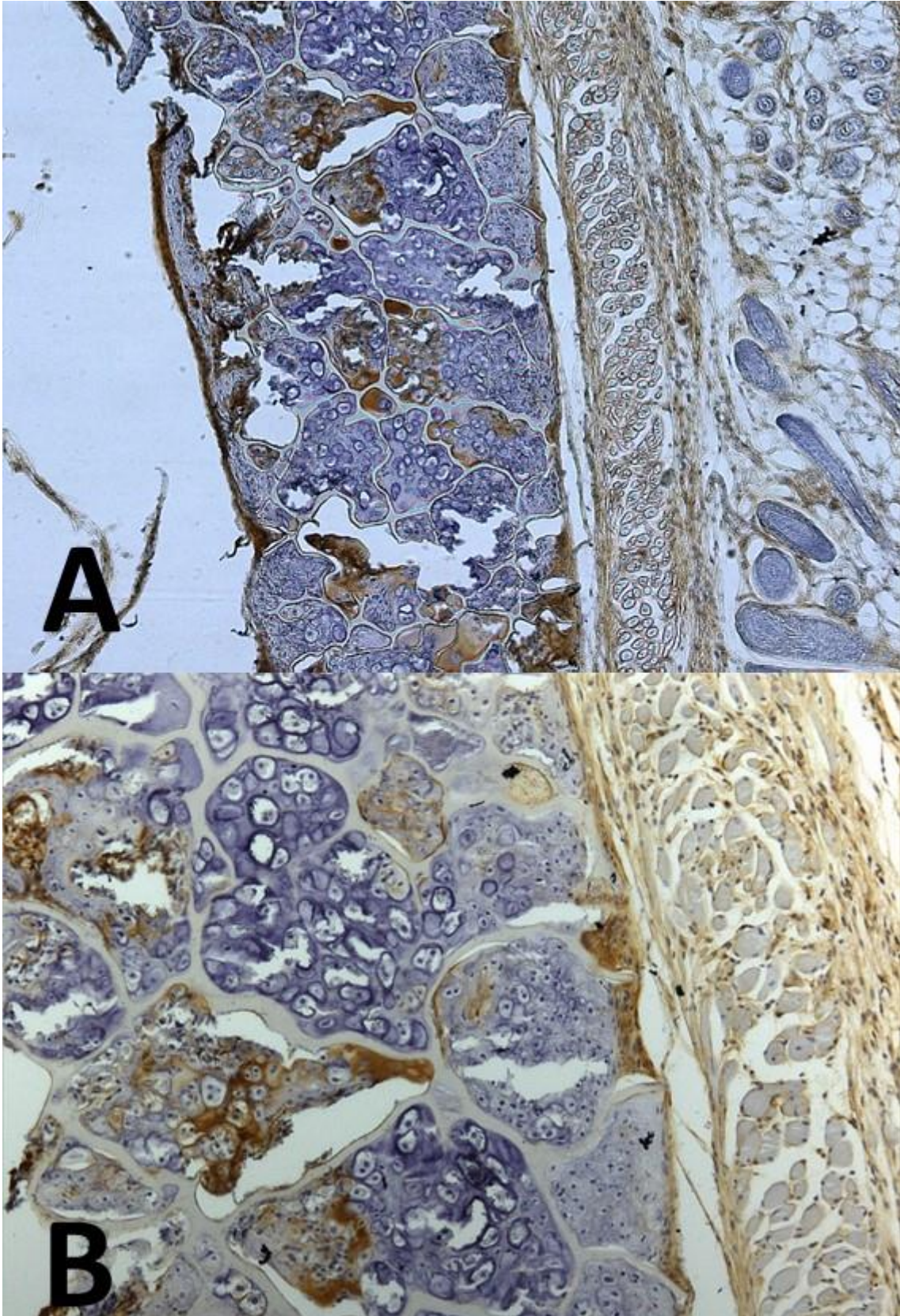


Figura 20. A, implante del soporte en ratón atímico. Tinción para colágeno II, 5x. La tinción no ha sido completa, tiñendo sólo algunos poros. B, detalle de la preparación anterior, donde se aprecia que los poros teñidos están rotos o abiertos. Colágeno II, 10x.

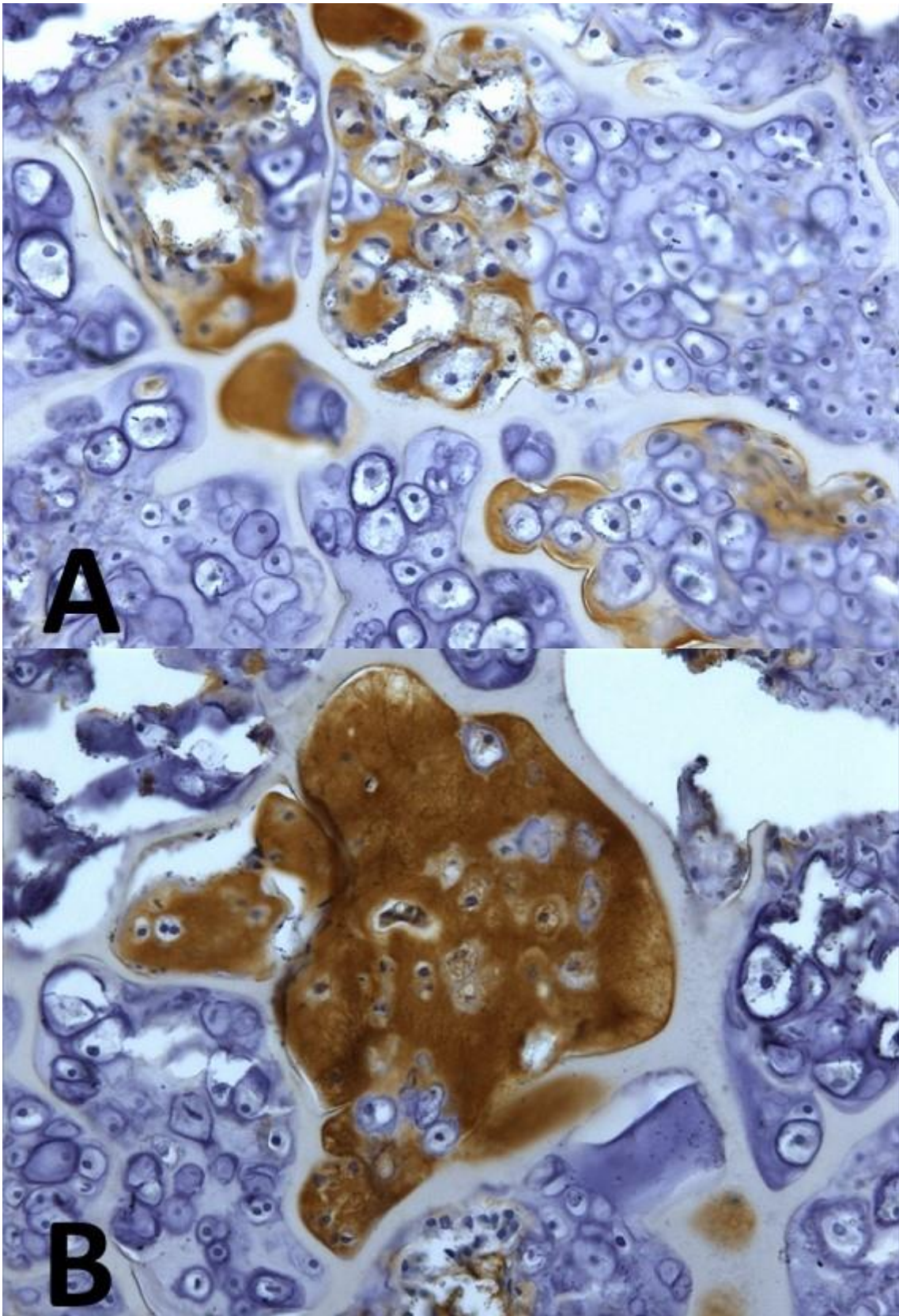


Figura 21. A, grupos de condrocitos llenando los poros del soporte, con positividad de su matriz extracelular para colágeno II, 20x. B, detalle de tinción de colágeno II en matriz extracelular. 20x.

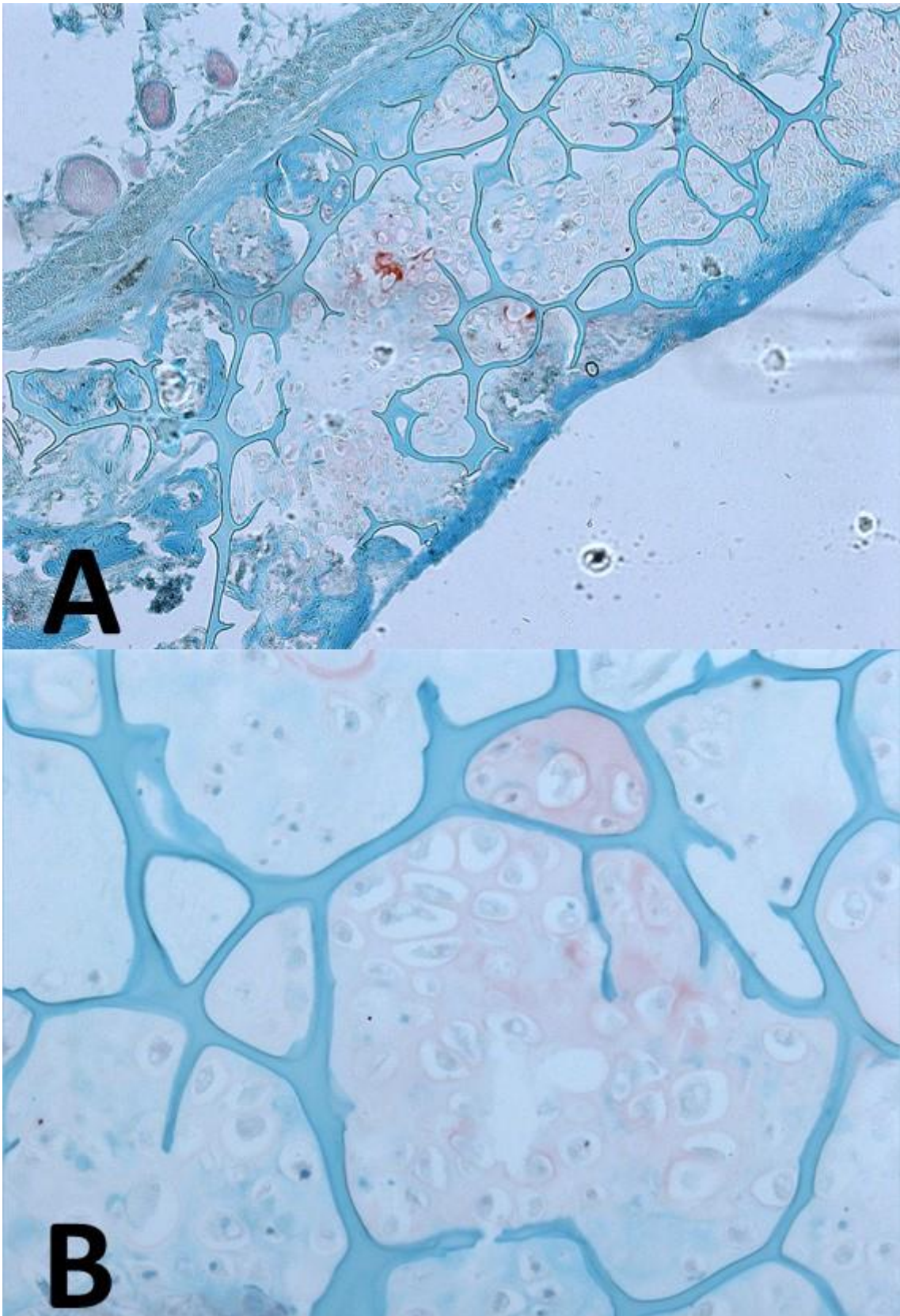


Figura 22. A, tinción de safranina con positividad para los glucosamínglicos de la matriz extracelular. Se observa tinción incompleta de la muestra. Safranina, 5x. B, detalle, safranina, 10x.

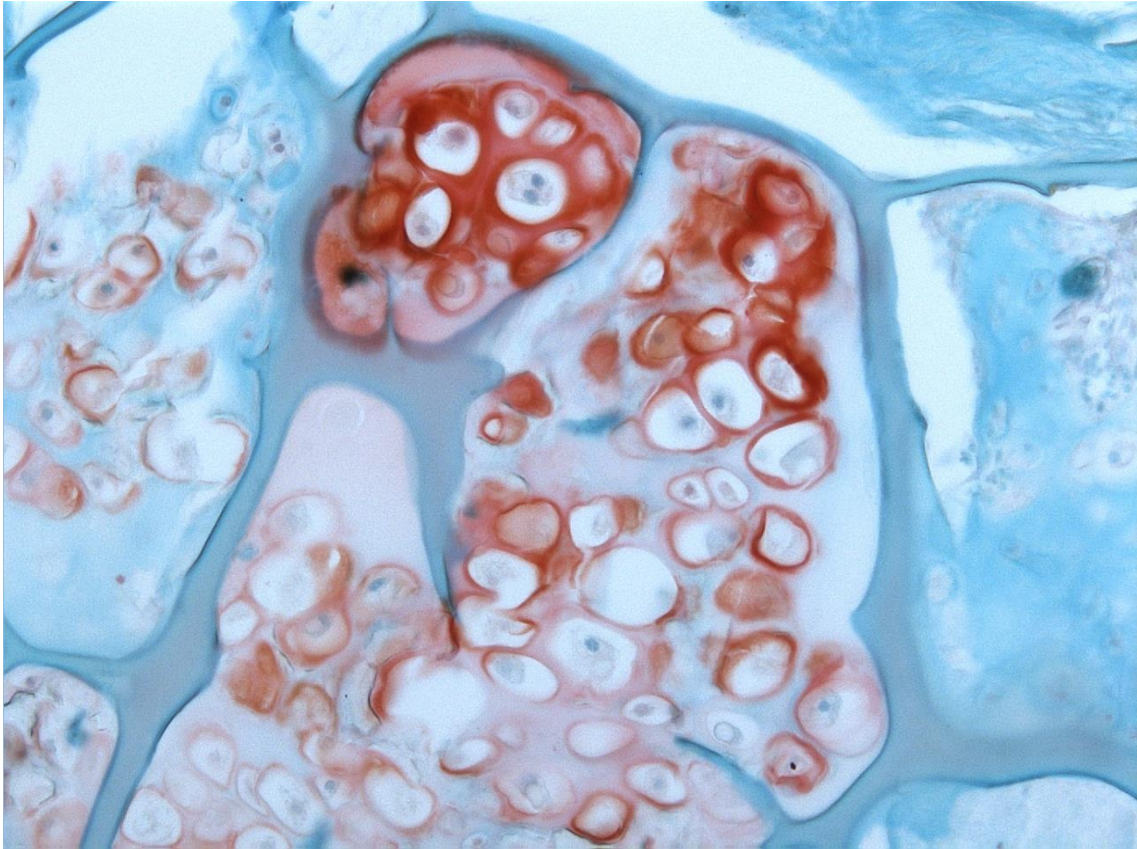


Figura 23. Detalle de positividad de matriz extracelular. Safranina, 20x.

Subestudio IV. Injerto de los cultivos celulares sobre soportes tridimensionales en defectos auriculares de conejos de Nueva Zelanda

Reparación de cartílago in vivo: Reparación de defectos auriculares en conejos de Nueva Zelanda

Al examen macroscópico, los defectos control donde se implantaron soportes sin células estaban rellenos por tejido conectivo blando, y presentaban restos del soporte celular en su superficie (Figura 24). Los bordes del defecto original en el cartílago nativo eran claramente identificables macroscópicamente, tanto al tacto como a la vista.

Los sitios de implante de los soportes con condrocitos mostraban un tejido duro y blanquecino reparando los defectos. No se observaba un límite claro entre el tejido nativo y el cultivado, excepto cierta tinción residual debida a restos del scaffold (figura 25). Tras la extracción en bloque, se apreciaba la acomodación del cartílago neoformado al defecto original, siguiendo la curva natural de la oreja del conejo (figura 26).



Figura 24. Imagen macroscópica del defecto control el día del sacrificio. Nótese la clara delimitación del defecto (entre flechas) que se halla relleno por tejido fibroso.

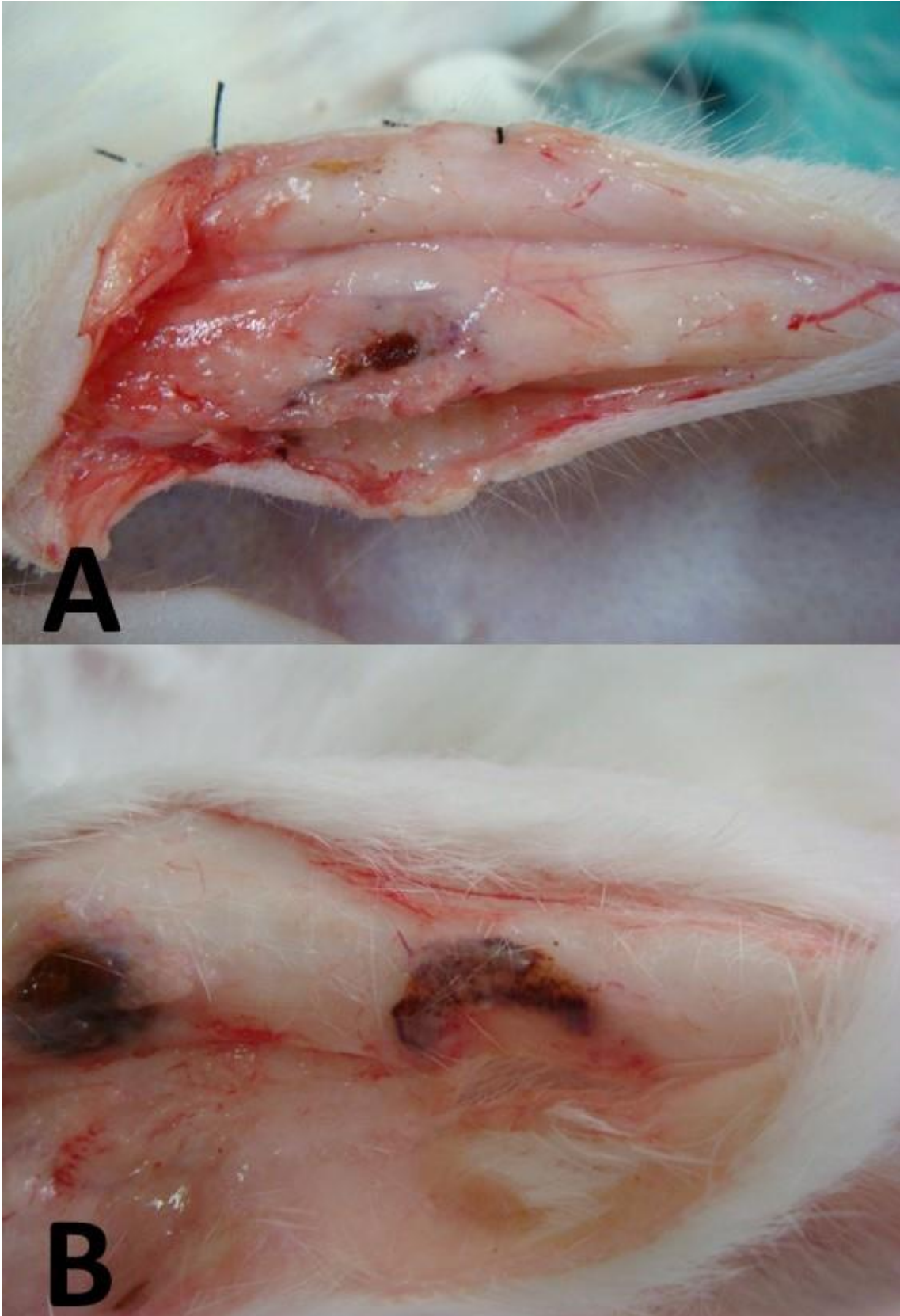


Figura 25. A, imagen del lugar de implante del soporte con condrocitos en el momento del sacrificio. Obsérvese reparación del defecto con restos de scaffold en la superficie. B, detalle donde se observa tinción residual del defecto experimental.



Figura 26. A, extracción en bloque del sitio de implante. Se observa tejido blanquecino duro con restos de soporte. B, detalle de una biopsia. Se observa buena adaptación a la forma original de la oreja.

El examen histológico de las muestras tomadas de los defectos control objetivó la presencia de tejido conectivo blando, con células multinucleadas rodeando los escasos restos de scaffold. No se observaron infiltrados inflamatorios ni imágenes de necrosis en las preparaciones (fig. 27-29). Las muestras de los lugares de implante de soportes con condrocitos mostraban tejido cartilaginoso reparando los defectos, junto con áreas calcificadas de formación ósea. No se halló solución de continuidad o borde claro entre el cartílago nativo y el neoformado (fig.30-32). El examen bajo el microscopio confocal de las biopsias marcadas con GFP no fue concluyente a la hora de demostrar presencia de GFP debido a la inmunofluorescencia natural de algunos tejidos (fig.33A). Por tanto, se procedió a la tinción de las muestras con inmunoglobulina antiGFP. Estas muestras tomadas del borde teórico y teñidas con inmunoglobulina antiGFP presentaban un marcaje positivo de las células del cartílago que reparaba los defectos, así como de las células que estaban integradas en las zonas de osificación (fig.33B-36).



Figura 27. Imagen histológica del tejido que rellenaba el defecto control. Se observa tejido conectivo junto con restos de soporte. Hematoxilina-Eosina, 5x.

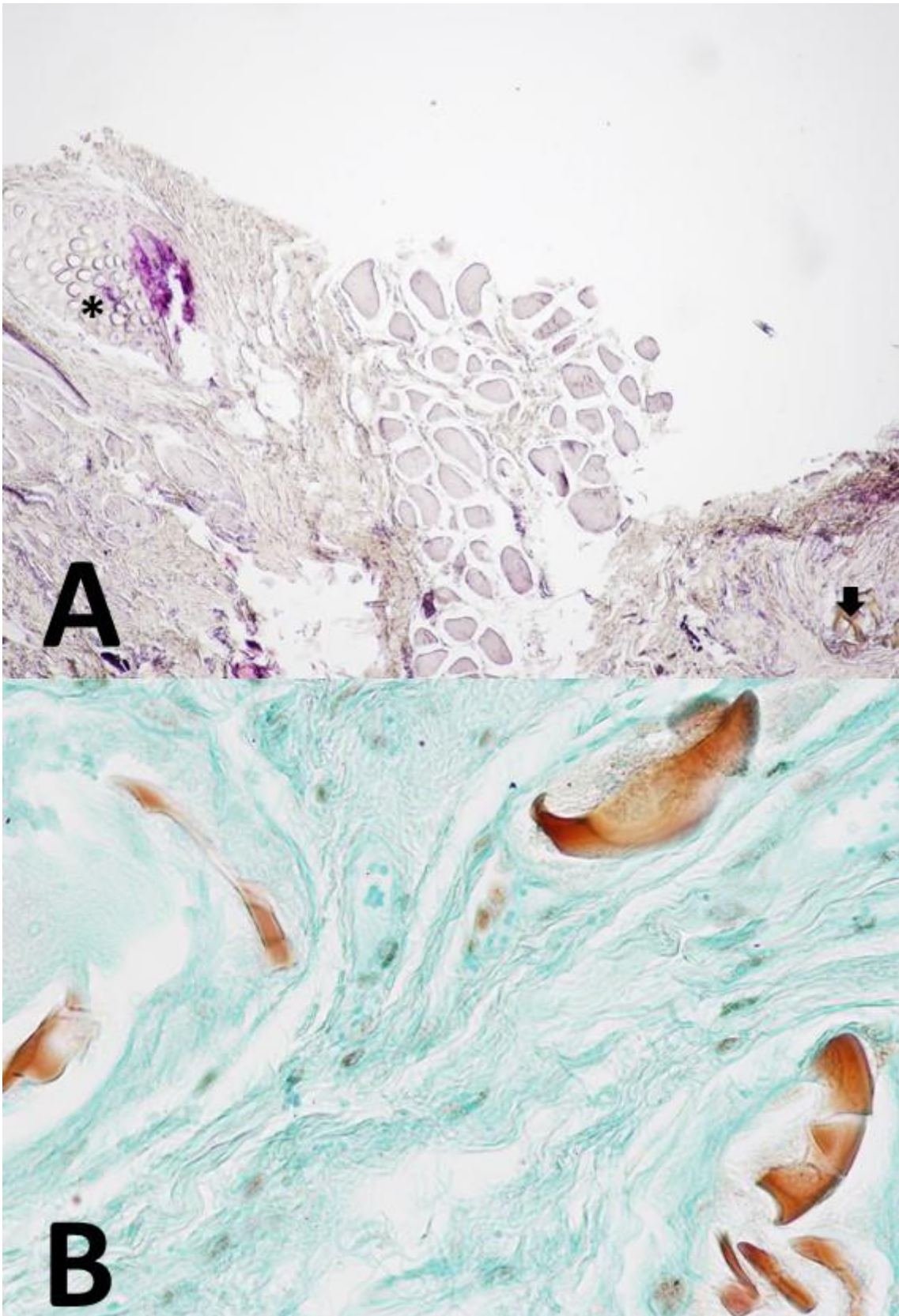


Figura 28. A, biopsia del defecto control. Se observa borde de cartílago nativo (asterisco) y defecto lleno de tejido conectivo con restos de scaffold (flecha) y muscular (propio de la oreja del conejo). Hematoxilina-Eosina, 5x. B, restos de scaffold en tejido conectivo. Safranina, 20x

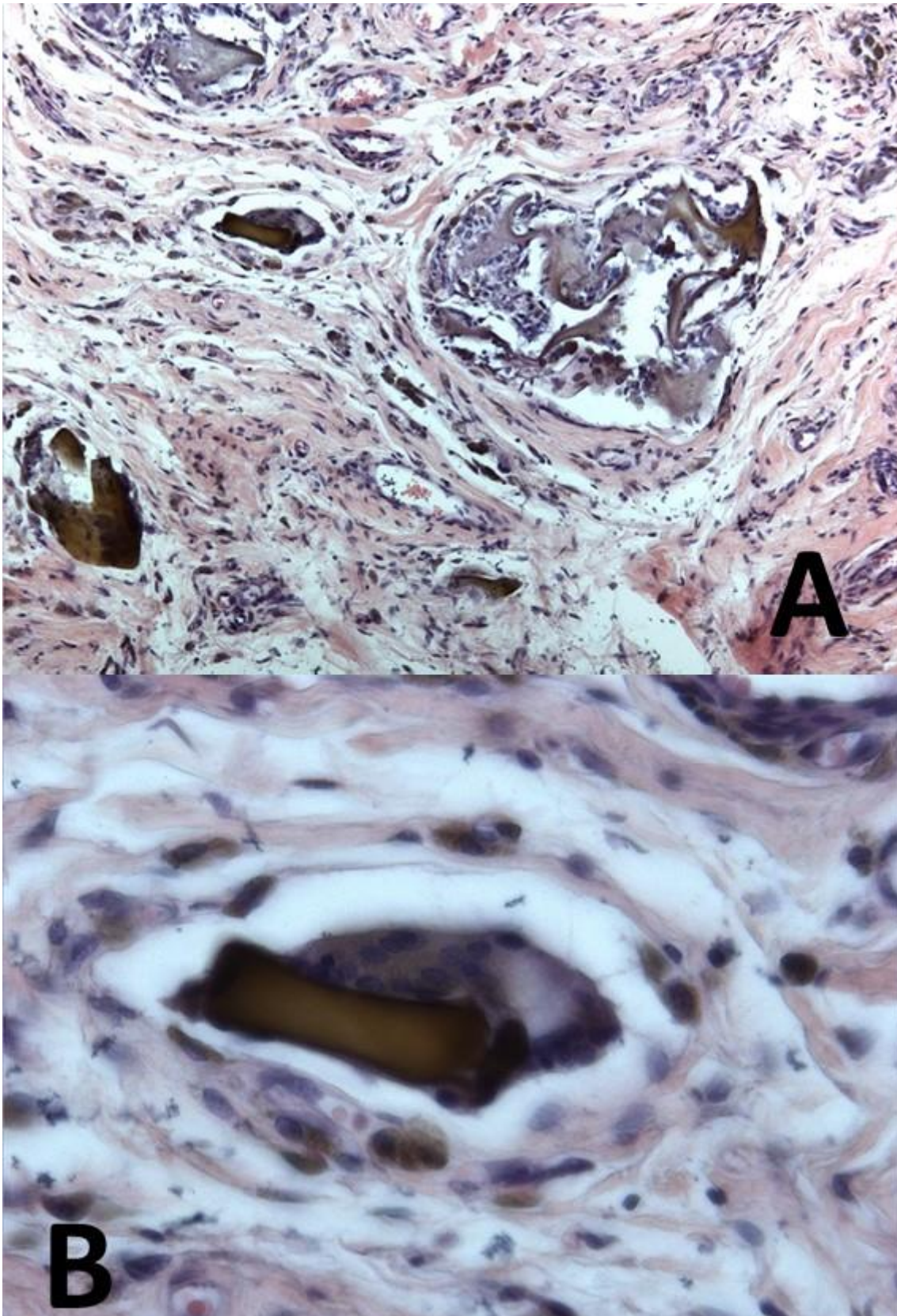


Figura 29. A, restos de scaffold rodeados por células gigantes multinucleadas en el defecto control. Hematoxilina-Eosina, 10x. B, detalle de célula gigante multinucleada fagocitando resto de scaffold. Hematoxilina-Eosina, 40x.

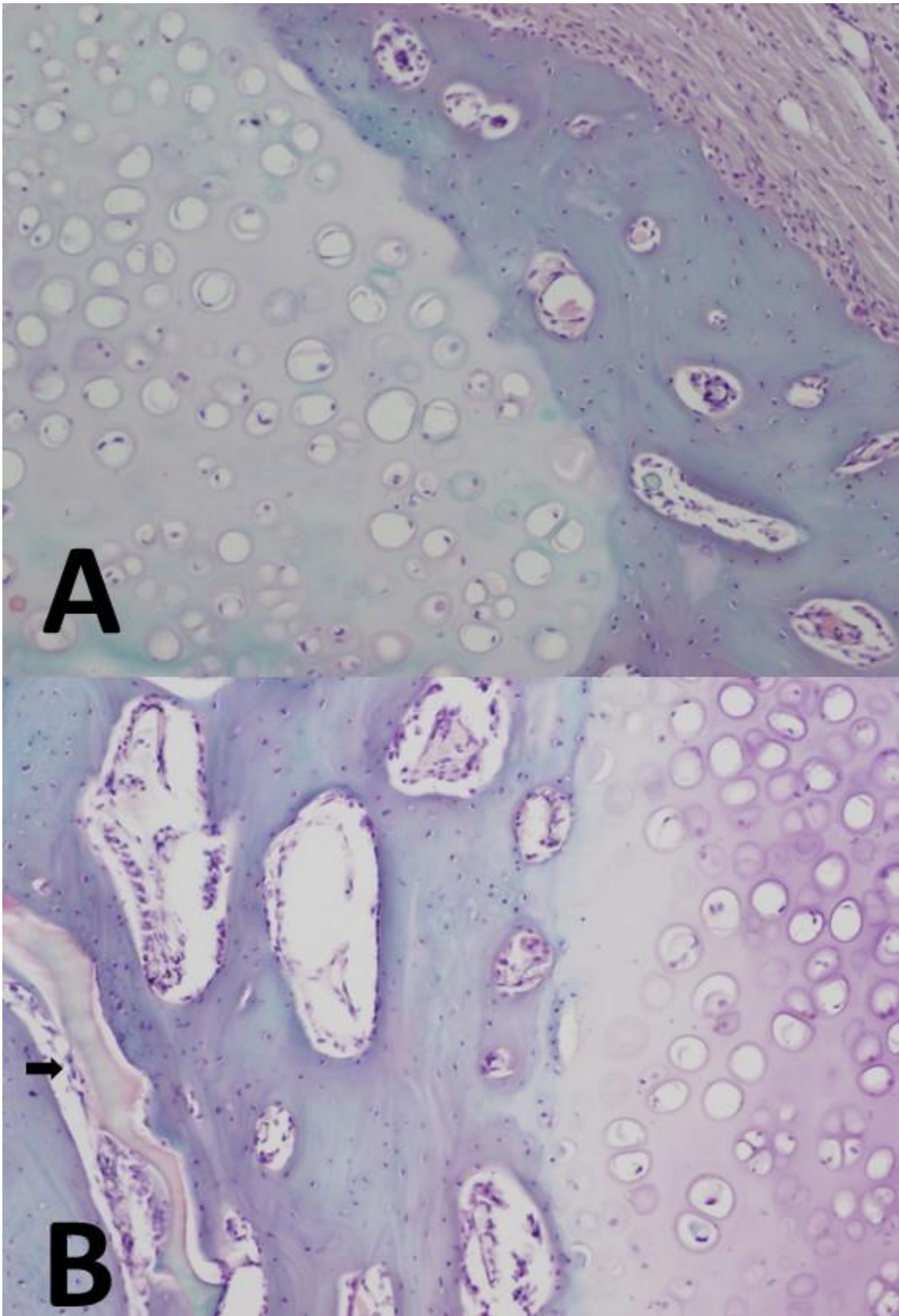


Figura 30. A, tejido reparando los defectos experimentales. Cartílago neoformado junto con áreas de diferenciación ósea. B, detalle del límite entre ambas áreas, con restos de scaffold embebidos en las zonas osificadas (flecha). Hematoxilina-eosina, 10x.

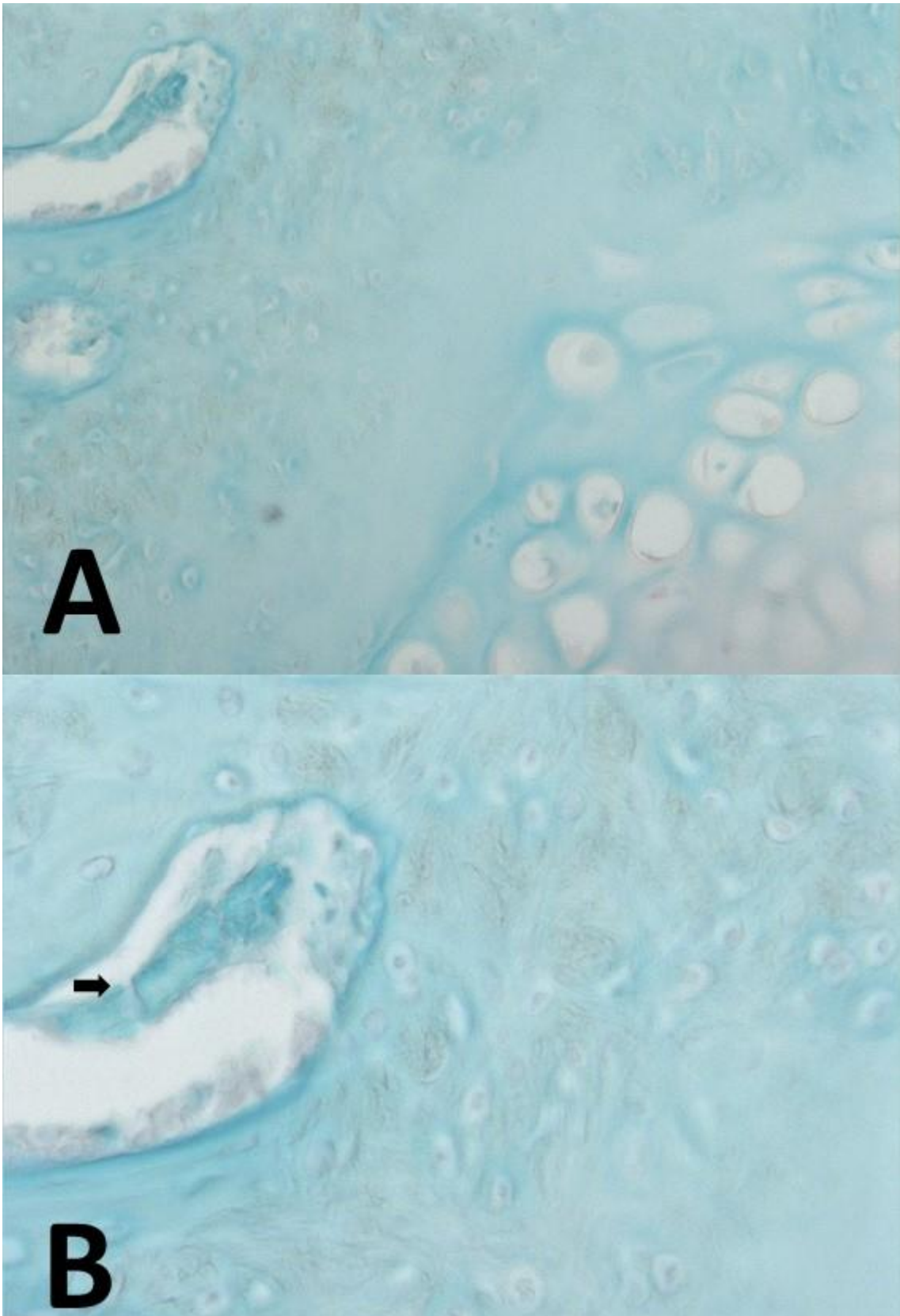


Figura 31. A, límite entre áreas de cartílago y de diferenciación ósea en biopsia de defecto experimental. B, detalle de zona osificada con restos de scaffold en su interior (flecha). Safranina, 20x.

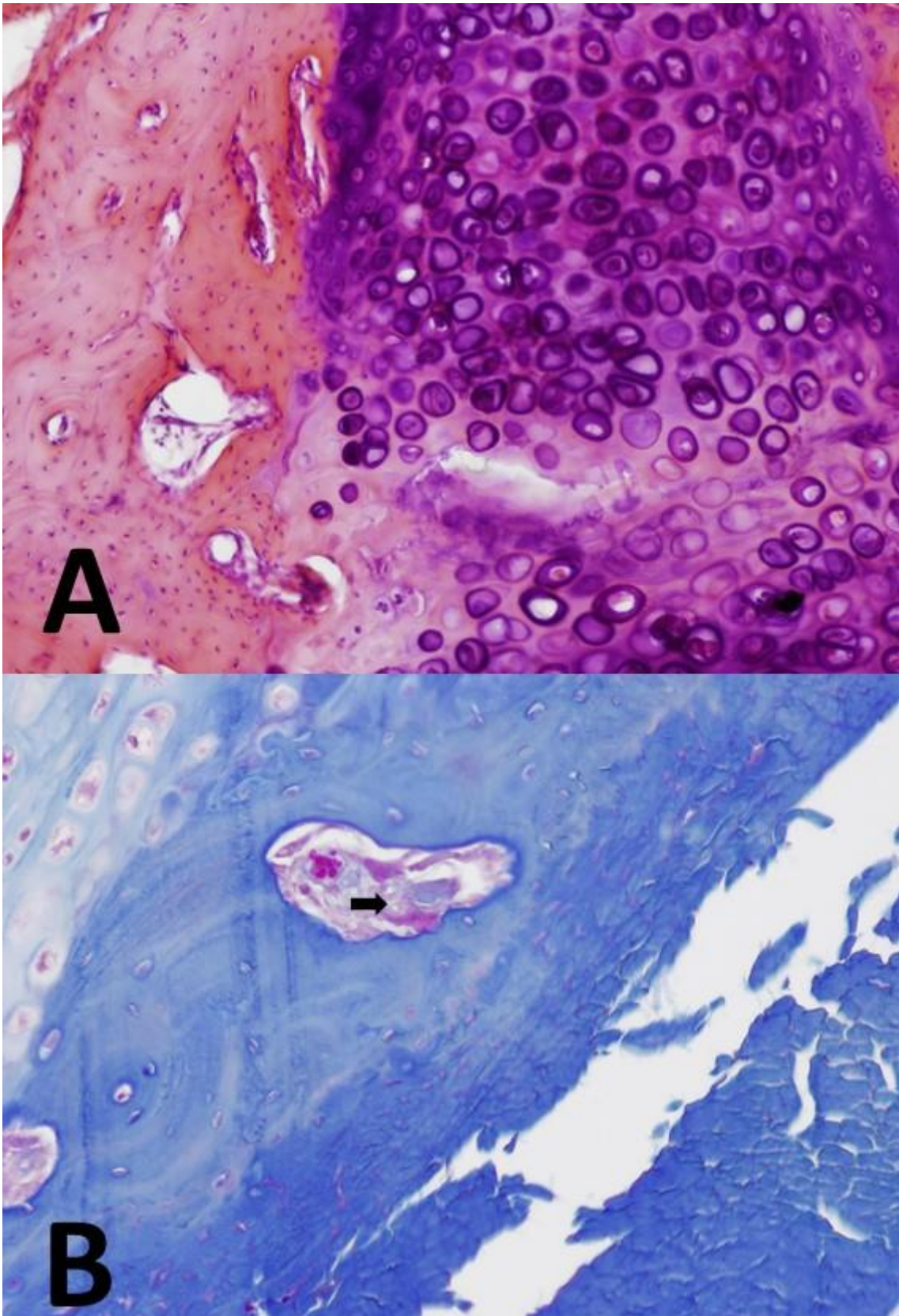


Figura 32. A, límite entre cartilago y área osificada. Hematoxilina-eosina, 10x. B, detalle de osificación concéntrica, con restos de soporte (flecha). Hematoxilina-eosina, 20x.

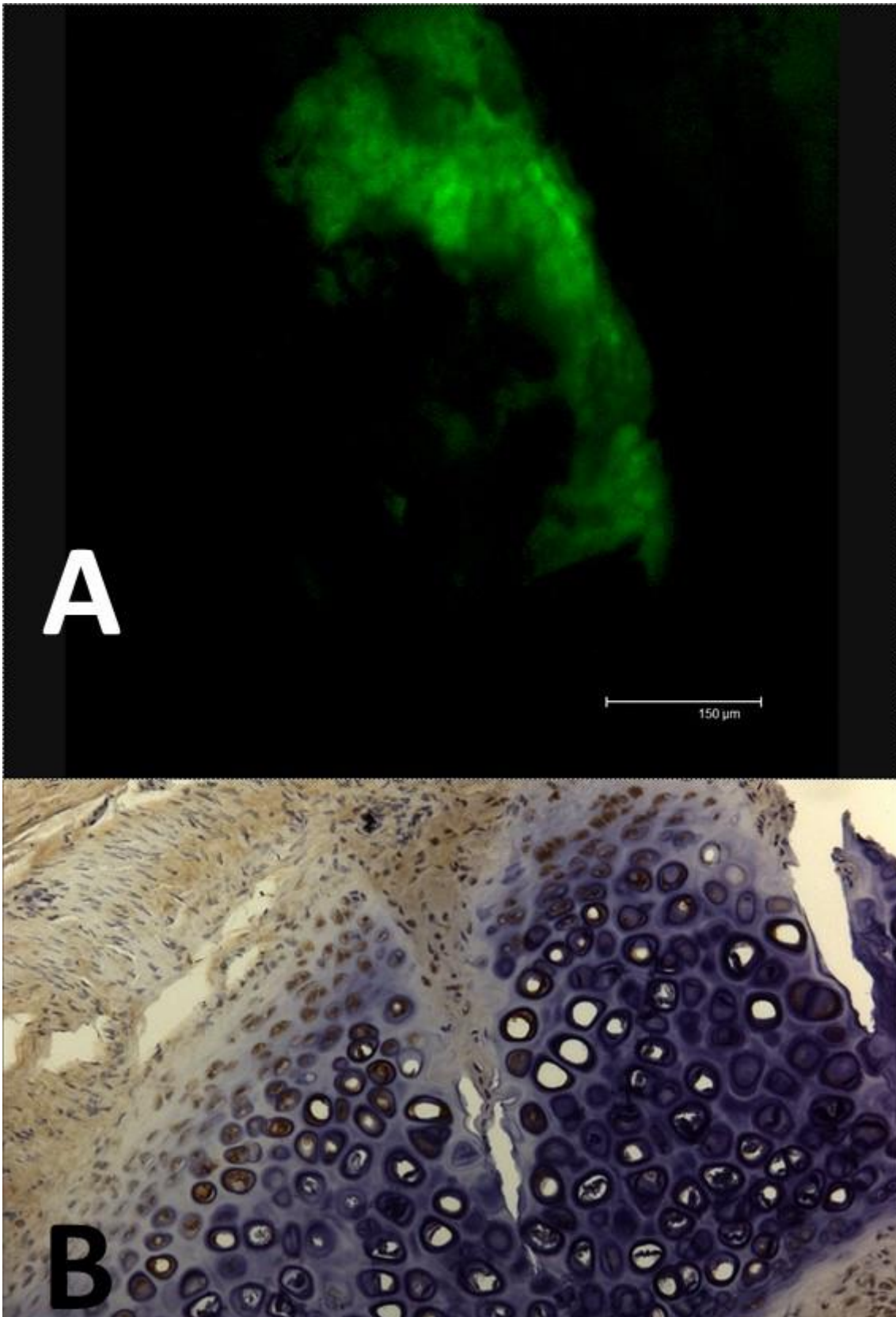


Figura 33. A, imagen de microscopio confocal. Implante de condrocitos marcados con GFP. La inmunofluorescencia natural del tejido no permite identificarlos correctamente. B, misma pieza marcada con inmunoglobulina antiGFP. Nótese marcaje en todo el espesor del cartílago.10x.

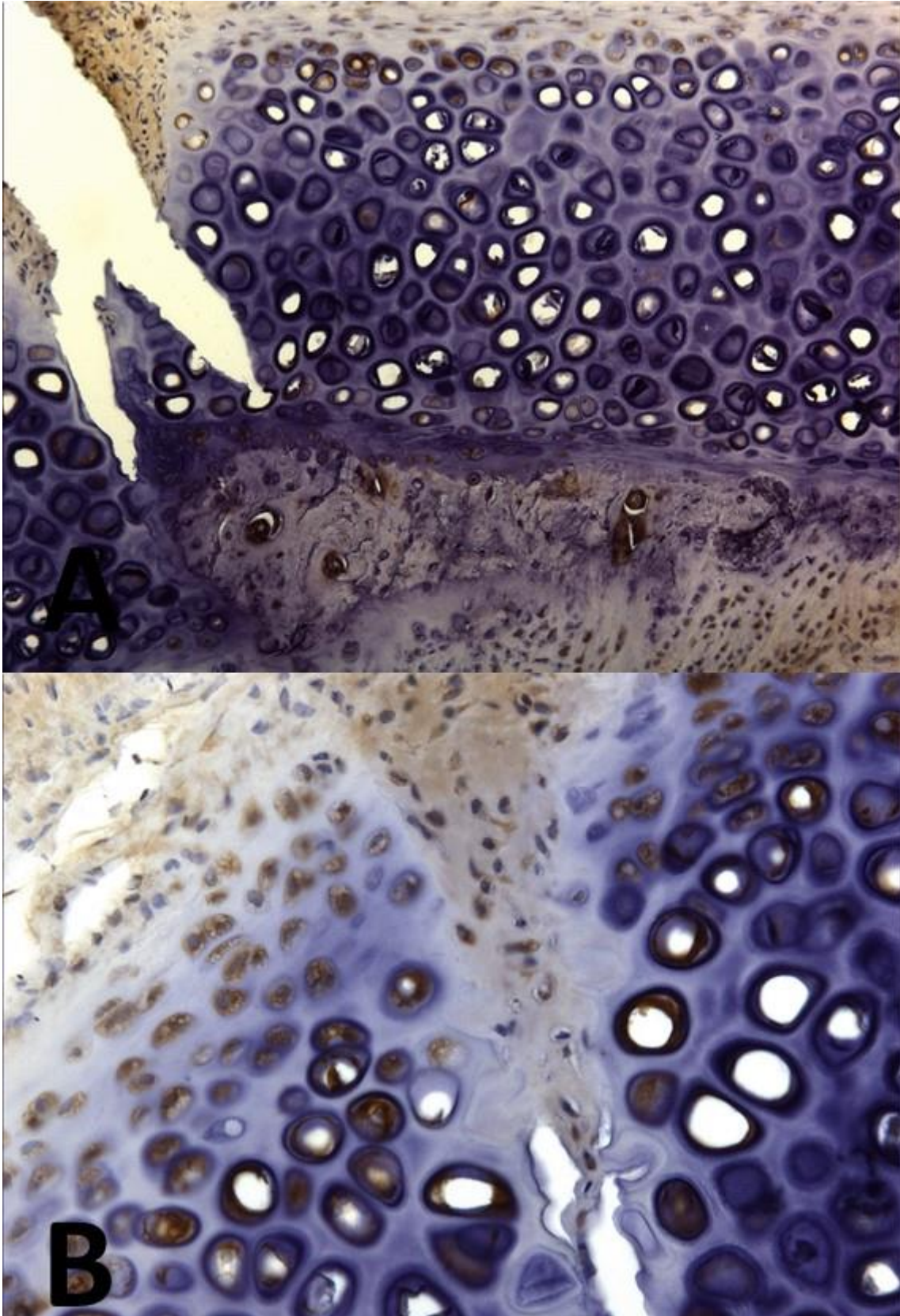


Figura 34. A, cartílago marcado con tinción anti-GFP junto con área de diferenciación ósea, también marcada. 10x. B, detalle de cartílago con marcaje anti-GFP en todo su espesor. 20x

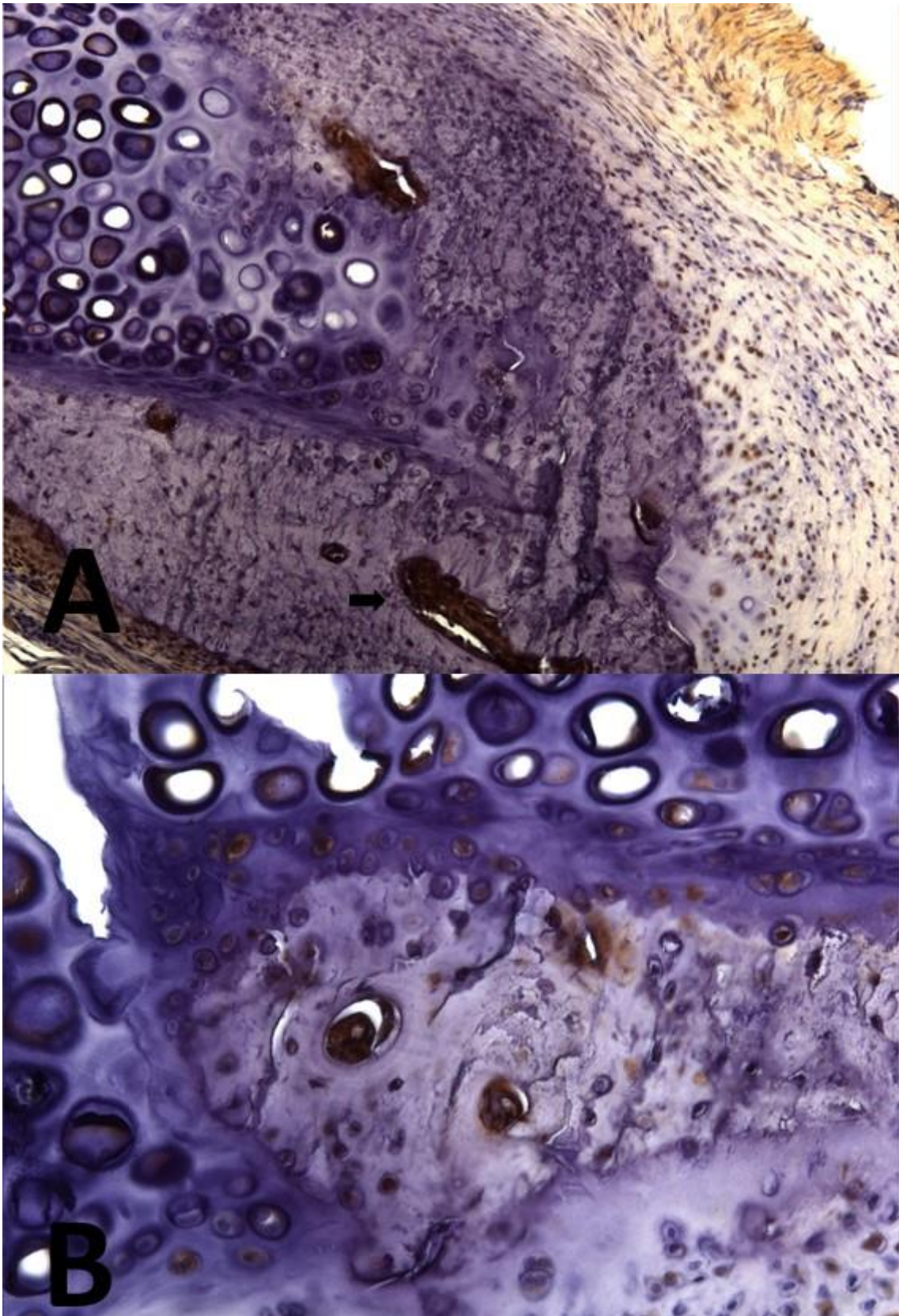


Figura 35. A, área osificada y marcada con tinción anti-GFP con restos de soporte (flecha), 10x. B, detalle de marcaje de área osificada, 20x.

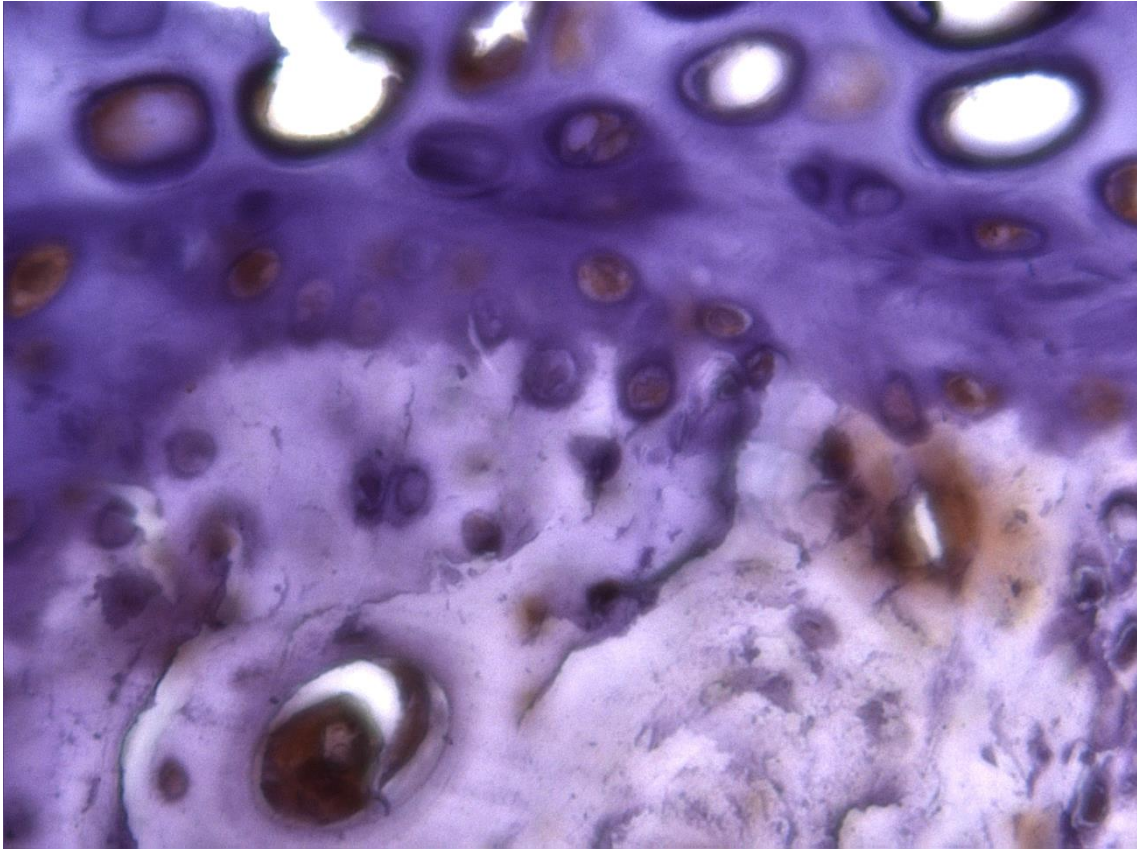


Figura 36. Detalle de osificación concéntrica con células marcadas con inmunoglobulina anti-GFP en su interior. 40x.

Discusión

La pérdida de tejidos debido a traumatismos, enfermedades o anomalías congénitas es un problema importante de salud a nivel mundial. Cuando esta pérdida tisular ocurre en el territorio facial, induce consecuencias fisiológicas y psicológicas importantes para el paciente. Por tanto, la reconstrucción del área facial a su estado estético y funcional previo es un deseo de los pacientes afectados. Los beneficios psicológicos y para la interacción social de los afectados han sido probados en múltiples estudios (Braun et al., 2010; Soukup et al., 2012).

Idealmente, la mejor manera de reconstruir defectos de hueso, cartílago, piel o mucosa oral es con tejido autólogo similar. Sin embargo no disponemos de una cantidad ilimitada de tejidos para utilizar, y muchas veces la obtención de tejido para reconstrucción implica una morbilidad importante de la zona donante. En el caso de la reconstrucción auricular, las técnicas más usadas implican la utilización de cartílago costal, tal como se señaló en la introducción. El resto de técnicas reconstructivas utilizando bien prótesis bien materiales sintéticos presentan resultados pobres y un alto riesgo de infección, extrusión y reacciones a cuerpo extraño. Esto las relega a un segundo plano en la escala reconstructiva, reservadas a pacientes en los cuales por sus características, sus procesos concomitantes o su edad la reconstrucción con cartílago costal esté contraindicada. Sin embargo, la recolección del cartílago costal proveniente de las sincondrosis de sexta, séptima y octava costilla tiene riesgos como la perforación pleural con el siguiente pneumotórax, el dolor en la zona donante o la deformidad estética en la zona. Estos riesgos cobran aún más importancia al tener en cuenta que la mayor parte de reconstrucciones auriculares completas se realizan en pacientes en edad pediátrica o adolescentes, en su mayor parte debido a una malformación congénita. El uso de una técnica que nos permita elaborar una estructura de cartílago sin la morbilidad proveniente de su obtención es una opción atractiva en estos casos. Los problemas derivados de las zonas donantes pueden ser superados mediante el uso de la ingeniería tisular, que proporciona tejidos o injertos individualizados a cada caso sin producir morbilidad o con una morbilidad mínima.

Las estrategias de ingeniería tisular basadas en el transplante de cultivos celulares requieren dos condiciones para tener éxito; primero, se debe ser capaz de obtener, expandir y rediferenciar un tipo celular a partir de una biopsia de tejido. Segundo, se necesita un soporte celular que proporcione un ambiente adecuado para las células durante el transplante, y que a su vez se degrade de una manera predecible para permitir una invasión vascular que nutra y sea la responsable última de la supervivencia de las células implantadas.

Estas técnicas comienzan con el aislamiento de una población celular determinada a partir de una biopsia tomada del paciente. Estas células se expandirán en un cultivo monocapa y se

sembrarán sobre un soporte natural o sintético que defina la forma del implante y proporcione un microambiente adecuado durante el trasplante y crecimiento celular. Idealmente, las células se adherirán al scaffold, proliferarán, se diferenciarán y formarán el tejido requerido.

Células

Para la obtención de cartílago, es posible usar dos tipos de células. Una opción es utilizar células maduras del propio tejido cartilaginoso, los condrocitos, o bien sus precursores inmediatos presentes en el tejido. La otra opción implica utilizar células toti- o pluripotenciales de tejido mesenquimal y diferenciarlas a una línea condrogénica. Este segundo método puede llevarse a cabo con células madre embrionarias, con los problemas éticos que conllevan su utilización, o células pluripotenciales procedente de tejidos mesenquimales como la médula ósea. El aspirado de médula ósea puede ser fraccionado y su componente estromal separado para aislar stem-cells mesenquimales (MSCs) derivadas de médula ósea. Las MSCs derivadas de médula ósea pueden ser expandidas in vitro y tienen el potencial de diferenciarse en estirpes celulares o tejidos derivados del mesoderma (hueso, cartílago, grasa, endotelio y músculo). Aunque estas células están bien estudiadas, un aspirado de médula ósea proporciona una cantidad sorprendentemente baja de células multipotentes, variando entre una entre 100.000 células nucleadas de médula ósea en la población adulta y una entre 2.000.000 en la población geriátrica. Esto hace que como fuente de células precisen un número enorme de expansiones in vitro antes de tener un número de células adecuado, lo que consume mucho tiempo y dinero, y aumenta las posibilidades de contaminación de los cultivos. Zuk ha descrito la obtención de MSCs a partir del tejido graso desechado de liposucciones. Esta fuente proporciona un número mucho mayor de células multipotentes (de $1,3 \times 10^8$ a $5,1 \times 10^8$ células por 300 cc de aspirado procesado) lo que convierte las estrategias de ingeniería tisular basadas en células en algo más realizable (Zuk et al., 2002, 2001).

A partir de estas células derivadas de la grasa, como ya se demostró en el trabajo de suficiencia investigadora (DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA DE INGENIERÍA TISULAR DE GRASA – UNIVERSIDAD DE OVIEDO, 2005) es posible obtener otros tipos celulares mesenquimales a partir del cultivo y la diferenciación de adipocitos sobre el scaffold previamente descrito.

En este trabajo se ha decidido tomar el condrocito como fuente celular para los cultivos por varios motivos: en primer lugar, se deseaba generar cartílago auricular, que como es de sobra conocido presenta una composición de la matriz extracelular diferente de otros tipos, sobre todo por su alto contenido en elastina. Para ello, nada mejor que obtener condrocitos auriculares para intentar conseguir un tejido similar al auricular.

Por otra parte, rediferenciando células pluripotenciales conseguimos un gran número de células del tipo deseado, pero también diversas cantidades de células en estadios previos al deseado, y de líneas celulares mesenquimales de otros tipos, por ejemplo fibroblastos, al no ser la rediferenciación completa. Por tanto es de esperar una población celular menos pura en los cultivos.

Esta diversidad de tipos celulares también ocurre en los cultivos in vitro de condrocitos, al desdiferenciarse durante la expansión en monocapa y presentar diversos grados de rediferenciación. Kamil et al. observaron que al reciclar el medio de cultivo sobrenadante habitualmente desechado en cambios periódicos y cultivarlo en monocapa, crecían células de las cuales un porcentaje correspondían a condrocitos (Kamil et al., 2004). Analizaron mediante citometría de flujo las poblaciones obtenidas de un cultivo en monocapa convencional y del cultivo en monocapa del sobrenadante, observando en el cultivo del sobrenadante dos poblaciones diferenciadas de células, un pequeño porcentaje de células de mediano tamaño y baja granularidad, correspondiente a condrocitos, y otro tipo celular predominante, de pequeño tamaño y más granular, correspondiente a un precursor más desdiferenciado, al que se refieren como “similar a una espora”. Al compararlo con el cultivo convencional, vieron que pese a que en éste último la población predominante era la correspondiente a los condrocitos, había un pequeño grado de solapamiento, reflejando la no homogeneidad completa de los cultivos. Aún así, la proporción de células desdiferenciadas o de estirpes diferentes a la condrogénica es menor cultivando condrocitos que utilizando stem cells.

En este estudio, para minimizar la variedad de tipos celulares presentes y obtener una línea celular lo más pura posible, se optó por partir de un tipo celular determinado, en este caso el condrocito auricular.

El condrocito es una célula de características muy propicias para la ingeniería tisular debido a su escasa demanda nutricional y la facilidad para su cultivo in vitro. El cartílago posee una escasa vascularización, lo que refleja unos requerimientos celulares nutricionales bajos para la supervivencia y la producción de matriz extracelular. (Kaufman and Tobias, 2003). Desde el primer cultivo ex vivo de condrocitos por Green y Dickens, varios grupos de investigación se han concentrado en obtener cartílago mediante cultivos celulares, de ahí que sean conocidas las consecuencias del cultivo en monocapa en los condrocitos. El cartílago es un tejido especializado de baja celularidad. Por ello, para obtener un número suficiente de células para su aplicación clínica a partir de una biopsia de cartílago se requieren múltiples pases de cultivo en monocapa. Sin embargo, tras 7-10 días de cultivos sucesivos en monocapa se va a producir una

desdiferenciación de los condrocitos maduros hacia un tipo celular más desdiferenciado, similar al fibroblasto en su fenotipo externo fusiforme, e incapaz de producir matriz extracelular cartilaginosa. Un signo de esta desdiferenciación es el cambio de síntesis de colágeno tipo II a colágeno tipo I, más característico del fibroblasto (Binette et al., 1998). Para conseguir crear cartílago, se debe lograr la rediferenciación de las células expandidas a condrocitos maduros. La mayor parte de los métodos de cultivo para la ingeniería tisular de cartílago requieren la expansión en monocapa de los condrocitos y su rediferenciación posterior en una disposición tridimensional proporcionada por un soporte celular o *scaffold* (Naumann et al., 2004).

Soporte

Se han descrito gran número de soportes para su uso en ingeniería tisular, desde hidrogeles y compuestos de fibrina a mallas de polímeros. Aunque algunos se han usado con diversos grados de éxito, aún no existe ningún *gold standard* para este uso. Las características de este soporte ideal serían una producción sencilla de bajo coste, una forma tridimensional modelable y mantenida en el tiempo, y una toxicidad e inmunogenicidad nula en el organismo receptor. (Yang et al., 2009). Sería además deseable poder utilizarla en condiciones autólogas respecto al paciente.

Ante estos requerimientos, la sangre aparece como un material de fabricación ideal. Los soportes basados en la sangre son una clase de biomateriales con un gran potencial en ingeniería tisular debido a su alto contenido en agua, parecido al de los tejidos del organismo receptor, su gran eficiencia en la siembra celular y su distribución celular uniforme (Ahmed et al., 2008). Ésta no es la primera vez que se utiliza la sangre como soporte; previamente se ha utilizado en la forma de un coágulo como soporte de cultivos celulares. De esta manera, se llevaron a cabo reparaciones in vivo de cartílago con éxito sembrando condrocitos en un coágulo sanguíneo e inyectando la mezcla en el subcutáneo de un animal de experimentación (Kim et al., 2004). Sin embargo, este método no permite mantener una configuración tridimensional determinada, y tampoco es posible rediferenciar cultivos celulares sobre ella, lo que limita la cantidad de células producidas mediante expansión de los cultivos. Como se mencionó previamente, la rediferenciación de los condrocitos desdiferenciados por la expansión en monocapa es un requisito indispensable para la producción de cartílago mediante ingeniería tisular. Posteriormente a nuestros trabajos (Gallego et al., 2010a, 2010b) se han publicado soportes similares fabricados a partir de la desnaturalización de la sangre o sus componentes mediante glutaraldehído (Elowson et al., 2013), pero utilizándolos para la producción de tejido muscular.

Hasta la fecha, éste es el primer trabajo publicado que utiliza este tipo de soportes en la producción de cartílago mediante ingeniería tisular.

El soporte utilizado en este trabajo cumple con muchas de las características ideales de un scaffold. Es barato y simple de elaborar, puede adoptar una forma tridimensional determinada, puede ser elaborado con sangre autóloga, y como se demostró en el trabajo de suficiencia investigadora y se ha demostrado en este trabajo, permite rediferenciar células sobre él.

Además de estas características, tres características estructurales resultan claves para el uso con éxito de un soporte en Ingeniería Tisular. Estas características son el tamaño de poro del soporte, la interconectividad entre los poros, y la velocidad de degradación del *scaffold*.

Trabajos previos han descrito la microestructura de diversos soportes y descrito sus propiedades. El rango de tamaño de los poros y su uniformidad van a afectar al comportamiento in vivo del soporte y las células implantadas en él, así como en su interacción con el organismo receptor. (Moran et al., 2003). En una revisión sobre modelos para la rediferenciación de condrocitos (Warren et al., 2003) ya se señalan la porosidad del soporte y la interconectividad entre los poros como dos características importantes para la invasión y el crecimiento de células sobre el soporte celular. El tamaño de poro influye en la mayor invasión por tejido vascular o conectivo, y la interconectividad entre poros ayuda a que todo el soporte sea invadido homogéneamente por células. En la literatura se encuentran trabajos con cultivos de condrocitos sobre soportes de diferente tamaño de poro como 0,2-8, 5,10-20, 40-60, 70-120, 100, 200, 400 y 380-405 μm (Oh et al., 2007; Yamane et al., 2007). La mayor parte de estos estudios comprobaron que los condrocitos proliferaban más y secretaban matriz extracelular en el mayor tamaño de poro usado en cada estudio. En general, los condrocitos prefieren un tamaño de poro óptimo, que promueva la difusión libre de nutrientes, lo que proporciona suficiente espacio para la secreción y colocación de grandes moléculas de proteoglicanos y colágeno, mientras permite las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Mohan and Nair, 2010).

Otra característica importante de un soporte celular es su degradación. Se precisa que el scaffold presente una degradación predecible y constante para facilitar la implantación y supervivencia de las células sembradas en él, y que esta degradación no lleve implícita la producción de metabolitos tóxicos para el receptor. Idealmente, el soporte debe durar lo suficiente como para proporcionar un microambiente a los cultivos celulares implantadas en el soporte y facilitar la producción de matriz extracelular, pero no demasiado para no impedir la neoangiogénesis del

organismo receptor que será la responsable última de la supervivencia de los tejidos. En estudios previos con soportes compuestos de polímeros de ácido poliglicólico (PGA) sembrados con condrocitos, se ha visto que una degradación temprana (2 semanas de vida media, reabsorción completa en 4 semanas) del soporte provoca la pérdida de la forma tridimensional del mismo (Vacanti et al., 1991). Ese mismo grupo de trabajo utilizando el mismo método logró producir un molde auricular de cartílago hialino cambiando la composición del soporte a un polímero mezcla de PGA y ácido poli(L-láctico) (PLLA), aunque la fragilidad del mismo les obligó a utilizar un tutor temporal externo durante las cuatro primeras semanas como molde para mantener la forma tridimensional (Cao et al., 1997). Por otro lado, se ha visto que los soportes compuestos únicamente por polímeros de PLLA, con tiempos de degradación in vivo de hasta dos años, producían una pérdida importante de células sembradas en él al no permitir la invasión de neovascularización en ellos, y la liberación prolongada de metabolitos podían inducir respuestas inflamatorias o inmunes tardías. Por tanto, el periodo ideal de degradación para un soporte celular en ingeniería tisular de cartílago debe encontrarse entre estos dos puntos. Utilizando un soporte compuesto por polímeros de PLLA y poli ϵ -caprolactona (PCLA), con tiempos de degradación completa de entre 4 y 6 meses, otros investigadores (ISOGAI et al.) lograron un armazón auricular compuesto de cartílago neoformado que mantuvo su forma tridimensional in vivo más allá de las 40 semanas. Por tanto, el tiempo de degradación ideal en soportes usados para IT de cartílago deberá aproximarse a este periodo.

El soporte utilizado en este experimento presenta poros comprendidos dentro del rango, entre los 150 y los 300 μm . El hecho de que el tejido cartilaginoso estuviera presente en todo el soporte sembrado y no quedaran áreas centrales sin cartílago es un dato que indica que la interconectividad entre poros es suficiente para permitir la invasión celular. En cuanto a la velocidad de degradación, se ha tratado de dar una respuesta a esta cuestión mediante el subestudio 1, como se detallará a continuación.

Microestructura y tiempo de degradación

Como se vio en el apartado de resultados, el soporte usado en este estudio, formado mediante la desnaturalización y posterior liofilización del componente proteico de la sangre, presentaba tamaños de poro situados entre los 150 y los 500 μm , un tamaño óptimo para la difusión de nutrientes, la secreción de matriz extracelular y la invasión de tejido nativo. En los implantes in vitro no se han observado áreas sin cartílago o deformidades del implante, lo que señala un crecimiento uniforme del cultivo celular dentro del soporte. Esto está en consonancia con la

observación hecha mediante microscopía electrónica de barrido de la interconectividad de prácticamente todos los poros, sin fondos de saco ni trayectos ciegos. La estructura presente en capas superpuestas permite una buena adherencia de los condrocitos y admite la secreción de grandes macromoléculas de colágeno y proteoglicanos para la formación de matriz extracelular. Observando las imágenes de los implantes *in vivo* y la gráfica de degradación, se observa un comportamiento determinado del soporte con dos fases diferenciadas. Tras una fase inicial de invasión y crecimiento celular, que comprende aproximadamente el primer mes, donde no hay pérdida aparente de volumen y se observa un aumento de peso por el tejido invasor, se produce una rápida degradación que llega al 50% del volumen del soporte al alcanzar el segundo mes. Esta pérdida de volumen viene acompañada por una pérdida de peso, pero no desaparece fundamentalmente debido a la formación de tejido conectivo en el interior del soporte. Al hacer la biopsia en bloque no hay manera de separar el soporte del tejido neoformado, con lo cual el peso no va a llegar nunca a ser cero. Se admite este hecho como una limitación de nuestro estudio. Quizás una manera más precisa de conseguir una aproximación a la velocidad de hidrólisis del soporte sea la utilizada en otros estudios (Moran et al., 2003), manteniendo soportes en una solución de PBS a 37°C y en agitación, y efectuar mediciones seriadas de su peso mediante desecación de las muestras para hallar el porcentaje de degradación. Sin embargo este método, pese a ser más preciso, mide la degradación en condiciones ideales *in vitro*, pero no tiene en cuenta la influencia del medio en un organismo receptor. En el caso de nuestro soporte, se ha visto que es muy estable en suero salino. Esto se puede deber a que su degradación probablemente esté causada principalmente por enzimas presentes en las células gigantes multinucleadas y fagocitos. De ahí que se considere suficiente este estudio para efectuar una aproximación al comportamiento *in vivo* del soporte, tomando como dato fundamental el análisis volumétrico de las muestras. Esta vida media, entendiéndola como el tiempo que tarda el soporte en perder el 50% de su volumen, se encontraría alrededor de los dos meses, con un tiempo hasta la degradación completa de aproximadamente cuatro meses. En cuanto a la forma de degradación, debemos suponer que contribuyen dos métodos: la hidrólisis, como en cualquier polímero formado por entrecruzamiento molecular; y la fagocitosis por células gigantes multinucleadas (figuras 10B, 12B, 13B, 29B), presente en múltiples de las muestras histológicas. La ausencia de infiltrados de polimorfonucleares o de células plasmáticas descarta reacciones inflamatorias o inmunes contra el soporte, y tampoco se ven áreas de necrosis o apoptosis celular, lo que descarta toxicidad celular de sus metabolitos. Por tanto, y a la vista de los resultados, se puede afirmar que el soporte producido cumple con todas las características de un soporte ideal para cultivar condrocitos, a saber, es simple y barato de producir, puede mantener una forma tridimensional determinada, tiene una microestructura

adecuada para el cultivo, la rediferenciación y la implantación de condrocitos, su tiempo de degradación es adecuado para fabricar estructuras tridimensionales de cartílago, no provoca reacciones inmunes o inflamatorias dentro del organismo receptor y su degradación no produce metabolitos tóxicos.

Producción de cartílago in vitro

La síntesis de cartílago maduro *in vitro* ofrece diversos problemas, debidos a la baja proliferación celular, la desdiferenciación con las expansiones múltiples requeridas para la obtención de un número adecuado de células, y la escasa producción de una matriz extracelular específica. (Chen et al., 2014b). Diversos factores, como la ausencia de nutrientes adecuados, las características del microambiente o la falta de un número crítico de células para una correcta interacción célula a célula o célula a matriz, han sido señalados como los causantes de estas dificultades. En nuestro caso y como se muestra en la sección de resultados, se ha conseguido expandir los condrocitos y, mediante su cultivo sobre el soporte, rediferenciarlos a un fenotipo maduro. Sin embargo, tanto las imágenes de microscopía electrónica de barrido como las histológicas objetivan que no se ha producido síntesis de matriz extracelular. Las razones para este suceso son desconocidas; sin embargo, se observa que el mismo soporte sembrado con condrocitos rediferenciados implantado in vivo es capaz de producir cartílago. Este hecho apunta a una ausencia de nutrientes específicos o a la falta de un microambiente adecuado que impide la síntesis de matriz extracelular *in vitro*. Estudios previos han demostrado que condiciones externas como la presión o la hipoxia, presentes en el entorno habitual del cartílago, estimulan la producción de matriz extracelular. Se ha visto que la hipoxia con oxígeno al 5% o al 3% estimula la expresión de colágeno tipo II y la síntesis de matriz de cartílago hialino (Hansen et al., 2001; Legendre et al., 2013; Scherer et al., 2004). También la aplicación de presión cíclica intermitente sobre los cultivos estimula la producción de matriz extracelular. Se ha visto que la aplicación de una fuerza de compresión axial de 1kPa en ciclos de 1 Hz durante 30 minutos al día estimulaba la producción de agregan (proteoglicanos) y colágeno tipo II (Waldman et al., 2006). La aplicación de presión hidrostática intermitente favorece el cultivo de condrocitos a largo plazo y la formación de un implante o constructo cartilaginoso (Hu and Athanasiou, 2006). Para intentar reproducir estas condiciones externas y suplementar los cultivos in vitro con nutrientes y factores de crecimiento, favoreciendo la formación de matriz extracelular y consiguiendo implantes de cartílago para su transplante, se han desarrollado varios tipos de biorreactores. Los biorreactores son sistemas de cultivo que permiten una modificación del

medio de cultivo y del microambiente para facilitar o potenciar los cultivos de su interior. Se han descrito tres tipos: los biorreactores de lote o *batch bioreactors*, que con un mismo medio de cultivo modifican las características del microambiente, por ejemplo mediante un agitador magnético; los biorreactores de lote alimentados o *fed-batch bioreactors*, en los que a un medio de cultivo se le van añadiendo periódicamente nutrientes o factores de crecimiento que estimulen los cultivos celulares presentes en su interior; y los biorreactores de flujo continuo, donde al medio de cultivo presente se le añaden nutrientes y se le extraen desechos, formando un ciclo constante para mantener un microambiente óptimo para las células en su interior. Este tipo de dispositivos permiten controlar las condiciones del microambiente, fijando una determinada tensión de oxígeno, pH, cantidad de glucosa o presión mecánica, por ejemplo, que influirán en el crecimiento celular y en la síntesis de matriz extracelular (Pörtner et al., 2005).

Los biorreactores son útiles en la formación de cartílago, pero presentan diversos problemas para su utilización, entre ellos su elevado precio, y la dificultad para sembrar, manejar los cultivos y añadir nutrientes en un ambiente estéril. Estas características fueron determinantes para evitar su uso en nuestro estudio, quizás con su utilización se habría conseguido un implante de tejido cartilaginoso *in vitro*. En cuanto a las condiciones de hipoxia y de presión, más fácilmente aplicables, no fueron incluidas en el diseño original del estudio. Dado que la implantación del soporte sembrado con condrocitos rediferenciados en subcutáneo produjo tejido cartilaginoso maduro, se decidió no cambiar el diseño y continuarlo haciendo énfasis en el trasplante de cultivos de condrocitos y no de piezas de cartílago. Sin embargo, el mismo método de cultivo y rediferenciación *in vitro* combinado con presión externa y condiciones de hipoxia y glucosa baja puede resultar en una producción de cartílago *in vitro*. Se deja esta pregunta sin resolver para posteriores estudios.

Producción de cartílago in vivo

En este subestudio, la elección del ratón atímico como animal de experimentación, diferente de los conejos de Nueva Zelanda de los que provenían los condrocitos, se debió principalmente al hecho de que trabajar en condiciones de inmunosupresión nos permitía utilizar condrocitos de conejo que teníamos disponibles de otros experimentos.

El implante del soporte sembrado con condrocitos en el tejido subcutáneo de un ratón atímico fue capaz de formar tejido cartilaginoso maduro, con una matriz extracelular positiva para tinciones específicas para colágeno tipo II y glucosaminglicanos (safranina). Pese a que en las preparaciones se observan áreas de matriz sin teñir, este hallazgo puede ser debido a la

dificultad de teñir material incluido dentro de los poros del soporte. En aquellos poros en los que el soporte se había roto, la positividad para la matriz es completa como se demuestra en las figuras 21 y 23. Sin embargo, la matriz extracelular no se marca con tinción para elastina, señalando un contenido bajo o nulo en dichas fibras. Este hallazgo es consistente con lo observado en varios experimentos con cultivos de condrocitos auriculares. Naumann cultivando y rediferenciando condrocitos auriculares y de septo nasal en un sistema cerrado in vitro sin soporte celular consigue formar un disco de cartílago con matriz extracelular positiva para fibras de colágeno de tipos I, II, V, VI y X, pero no consigue demostrar la presencia de elastina en el tejido neoformado ni con tinciones ni con métodos de inmunohistoquímica (Naumann et al., 2004). Este nuevo cartílago resulta más rígido y frágil que el nativo. Para resolver este problema y crear tejidos más elásticos, otros autores cocultivaron condrocitos auriculares con células provenientes del músculo liso, gran productor de elastina y glicosaminoglicanos, obteniendo un tejido más elástico que el cartílago nativo pero más rígido que el músculo liso (Brown et al., 2000), con presencia de gran cantidad de elastina en el nuevo tejido. De nuevo, se trata de una cuestión sin solucionar que se deja para estudio posterior. Sin embargo, hay que resaltar que los métodos actuales de reconstrucción auricular utilizan cartílago costal para el armazón auricular, con lo cual el método presentado en este trabajo produce un resultado similar al utilizado en las técnicas reconstructivas sin la morbilidad asociada a éstas, mejorando por tanto el gold standard actual.

Reparación de defectos experimentales

Como se mencionó en la sección de resultados, en los defectos experimentales en orejas de conejos en los que se introdujeron soportes celulares sembrados con condrocitos rediferenciados se halló un tejido blanquecino y duro sin límite claro respecto al tejido nativo. Esto contrastaba con el tejido conectivo que rellenaba los defectos control, donde se habían introducido soportes sin células. Este hecho demuestra que el soporte por sí solo no repara los defectos experimentales, ni que el tejido cartilaginoso auricular es capaz de regenerarse *per se*. Siendo posible aún una contribución de ambas partes, cartílago nativo y cultivo de condrocitos, en la reparación, los condrocitos de un soporte fueron previamente marcados mediante un retrovirus que codificaba para la Proteína Verde Fluorescente (GFP). Tras los meses de implantación y la biopsia, se analizó la muestra mediante microscopía confocal, pero la inmunofluorescencia natural de los tejidos y el soporte impidió un análisis efectivo de la muestra. Para superar este escollo, se utilizó una tinción de inmunoglobulina anti GFP para

marcar las células provenientes del soporte. En las figuras 33B y 34 se puede ver cómo las células marcadas abarcan todo el espesor del cartílago que repara la lesión, por tanto se puede concluir que el responsable de la reparación del defecto experimental es el cultivo de condrocitos sembrado en el soporte.

Junto con los condrocitos marcados, también se marcan células presentes en el interior de áreas calcificadas adyacentes al cartílago, y en relación con restos de soporte celular. Estas zonas presentan en varios puntos estructura de hueso maduro, con canales ocupados por células al igual que los osteocitos dentro de los canales de Havers (figuras 35B y 36).

El significado de esta formación de hueso es desconocido. Sin embargo, la calcificación de cultivos de condrocitos no es un hecho infrecuente en la literatura. Johnson en un experimento donde colocaba cultivos de condrocitos de diferente origen suspendidos en fibrina entre dos discos de cartílago auricular encontraba calcificación en un 40% de las muestras. Atribuye este hallazgo al tejido subcondral presente en los discos de cartílago, pero sin embargo no hallaba calcificación en los constructos que utilizaba como control y que sólo tenían fibrina entre los discos de cartílago, lo que sugería que los cultivos de condrocitos tendrían un papel en la formación de la calcificación (Johnson et al., 2004). En un estudio en el que produce cartílago in vitro sobre una membrana de PET a partir de un cultivo de condrocitos en un biorreactor, los autores observan calcificación en la matriz cartilaginosa neoformada, pero no formación de hueso. Explican este hallazgo en base a la menor cantidad de glicosaminoglicanos y la ausencia de elastina del tejido formado (Naumann et al., 2004). Los glicosaminoglicanos provocan una mayor rigidez durante la compresión, debido a las uniones electrostáticas, y una resistencia al paso de fluido a través del tejido (Buschmann and Grodzinsky, 1995; Maroudas and Bullough, 1968). La red de fibras de colágeno contribuye en gran medida a la resistencia tensil y contra el cizallamiento del tejido, pero su influencia en la resistencia a la compresión es mucho menor (Rotter et al., 2002). Estas diferencias en la composición provocarían una disminución del módulo de equilibrio y un aumento de la permeabilidad hidráulica del constructo, y podrían ser la causa de la calcificación u osificación de las muestras, que causarían un aumento del módulo agregado (rigidez del material cuando el fluido ha dejado de moverse a través de él).

Otros autores introdujeron cultivos de condrocitos en diferentes soportes (fibrina, agarosa, PGA inmaduro y PGA cultivado durante 5 semanas) dentro de defectos circulares en el cartílago articular de explantes de rodillas de terneras, unos desvitalizados mediante congelación y otros "vivos", y los cultivaron durante 20 y 40 días in vitro. Analizando el crecimiento de los tejidos y la síntesis de matriz mediante la medición de la cantidad de DNA producido, hidroxiprolina y glucosaminoglicanos, observaron dos hechos: los cultivos dentro del cartílago desvitalizado

sintetizaban aproximadamente lo mismo que cultivados in vitro, mientras que dentro del cartílago vivo sufrían una inhibición de su síntesis; y que dicha inhibición era mayor cuanto más permeable o inmaduro era el cultivo implantado (Hunter and Levenston, 2004). Atribuyeron estos hechos a la secreción de factores solubles por el cartílago nativo, que influirían en el comportamiento de las células implantadas. En el caso del cartílago desvitalizado, la ausencia de secreción de dichos factores o la liberación de factores adicionales debido a la degradación de la matriz extracelular contrarrestaría el efecto inhibitor. Del mismo modo, si el cultivo implantado es más maduro habrá secretado matriz extracelular que le permita “escondese” de estos factores inhibidores, mientras que si el implante está compuesto de células cultivadas no tendrá tiempo de sintetizar matriz y será afectado por completo por estos factores. Dado el efecto inhibitor del tejido nativo en algunos sistemas, los autores recomiendan el implante de cartílago producido por ingeniería tisular lo más maduro posible con vistas a resistir esta influencia. En nuestro caso, se implantaron cultivos celulares rediferenciados durante tres semanas, fenotípicamente similares a condrocitos maduros, pero sin matriz extracelular. ¿Podría ser este hecho el responsable de la calcificación de las muestras? El tejido cartilaginoso producido en el subcutáneo del ratón atómico no presentaba áreas de calcificación, por lo que es posible que algún factor secretado por el cartílago nativo influya en esta diferenciación. Sin embargo, en el trabajo presente los defectos experimentales se rellenan con tejido cartilaginoso maduro, infiriéndose que la modulación producida por el receptor no es suficiente como para impedir la reparación del defecto. Además, se produce una integración completa e indiferenciable entre el tejido neoformado y el tejido nativo, hecho que no ocurre en el estudio mencionado previamente. Esta buena integración habla en contra de una reacción inhibitoria suficiente del receptor contra el cultivo implantado. En otros estudios realizados utilizando el soporte del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos junto con cultivos de osteoblastos, se ha observado la reparación de defectos óseos mandibulares implantando constructos compuestos por soportes sembrados con osteoblastos en ellos (Gallego et al., 2015). Es interesante remarcar que aunque los defectos control donde no se habían implantado constructos permanecían sin evidencia de formación de hueso, en aquellos defectos en los que se había implantado un soporte sin células se había formado hueso, en menor cantidad que la hallada en los sitios de implante de los soportes con osteoblastos, pero reflejando una cierta capacidad osteoinductora del soporte *per se*. Este hallazgo es coincidente con el hecho de que en las áreas de diferenciación ósea o adyacente a ellas se observan restos sin digerir del scaffold (figuras 30B, 31B, 32B, 35A).

También se ha visto en estudios previos (Burghartz et al., 2015) que un aumento de la vascularización local tiende a producir un efecto desdiferenciador en los cultivos de condrocitos implantados *in vivo*. En un estudio se comparaba el cartílago producido *in vivo* a partir de soportes de fibrina y policaprolactona sembrados con condrocitos, unos con un bucle arteriovenoso implantado en su interior, y otros sin vascularización y utilizados como controles. Al analizar los resultados de las biopsias tras una semana de implante *in vivo*, se observó una mejor calidad del cartílago formado en los soportes control, junto con una mayor proliferación de tejido fibroso y una pérdida de los glicosaminoglicanos característicos del cartílago en los soportes vascularizados. Los autores explicaban este hallazgo en base a las características propias del cartílago: en este tejido, las células obtienen sus nutrientes principalmente por difusión y no se expanden en la presencia de vasos sanguíneos, hecho que explica la pobre capacidad reparativa de este tejido. En las muestras provenientes de los soportes implantados en los defectos auriculares de los conejos, las zonas de diferenciación ósea se encontraban habitualmente en la periferia del cartílago. Es posible que la interacción con el pericondrio, más ricamente vascularizado, pueda provocar una desdiferenciación de los condrocitos implantados que lleve a la formación de hueso.

Serían necesarios estudios más detallados para ver la procedencia específica de estas áreas de formación de hueso. No se conoce si cada uno de los factores mencionados previamente es suficiente para inducir una diferenciación ósea en el implante, o si es necesaria la conjunción de varios para provocar esta reacción. El subestudio de implante en el tejido subcutáneo del ratón atómico no consiguió demostrar calcificación en la muestra; quizás el implante del constructo soporte/condrocitos en el tejido subcutáneo permita producir cartílago maduro sin formación de hueso. En este sentido cabe reseñar el trabajo de Yanaga et al., en el que inyectan una solución de condrocitos cultivados suspendidos en medio de cultivo junto con la matriz condroide generada por los cultivos dentro de un bolsillo tallado a tal efecto en el tejido subcutáneo abdominal de varios niños con microtia. Seis meses después, esa mezcla ha formado un bloque de cartílago que utilizan para tallar armazones auriculares con el fin de reconstruir los pabellones auriculares ausentes (Yanaga et al., 2009). Aplicando esta metodología a nuestro estudio, sería posible implantar un soporte diseñado a partir de la forma especular de la oreja sana sembrado con condrocitos rediferenciados en el tejido subcutáneo, para obtener un implante de cartílago ya modelado y preparado para su uso en reconstrucción auricular. Se están llevando a cabo estudios que demuestren esta hipótesis y permitan la aplicación clínica de esta metodología.

Buscando nuevas aplicaciones para el constructo soporte/condrocitos y aprovechando esta capacidad de osificación, sería interesante valorar su utilidad en formación y reparación de hueso. Se ha visto que el abordaje tradicional de osteogénesis directa mediante ingeniería tisular, simulando una osificación intramembranosa, produce una vascularización pobre que lleva a una osificación débil. Un modelo que se asemeje a la osificación endocondral podría conseguir mejores resultados al aprovechar el potencial de los condrocitos para segregar señales angiogénicas que induzcan la formación de nuevos vasos y mejoren la reparación ósea. Numerosos autores (Bahney et al., 2016; Thompson et al., 2016) han investigado esta vía, mediante cultivos de stem cells diferenciadas a una línea condrogénica o de condrocitos cultivados con factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y proteína morfogenética de hueso 4, consiguiendo producir hueso de forma subcutánea o en defectos óseos. Esta línea de investigación resulta prometedora pero excede los objetivos de este estudio, por lo que se dejará para posteriores investigaciones.

Conclusiones

-El soporte desarrollado por el CCST y utilizado presenta características físicas y biocinéticas que lo hacen útil en estrategias de Ingeniería Tisular de cartílago.

-El soporte utilizado permite el cultivo y la rediferenciación de condrocitos in vitro, pero con el método utilizado no es posible producir cartílago in vitro.

-Es posible producir cartílago in vivo de forma ectópica (tejido subcutáneo) mediante el uso de soportes sembrados con condrocitos.

-Es posible reparar defectos experimentales en orejas utilizando soportes sembrados con condrocitos autólogos. Sin embargo, la producción ectópica de hueso, de etiología desconocida, limite el uso clínico de esta tecnología.

Bibliografía

Ahmed, T., Dare, E., Hincke, M., n.d. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng. Part B Rev.* 14, 199–215.

Bahney, C.S., Jacobs, L., Tamai, R., Hu, D., Luan, T.F., Wang, M., Reddy, S., Park, M., Limburg, S., Kim, H.T., Marcucio, R., Kuo, A.C., 2016. Promoting Endochondral Bone Repair Using Human Osteoarthritic Articular Chondrocytes. *Tissue Eng. Part A* 22, 427–435.

Bartel-Friedrich, S., 2015. Congenital Auricular Malformations: Description of Anomalies and Syndromes. *Facial Plast. Surg.* FPS 31, 567–580.

Binette, F., McQuaid, D.P., Haudenschild, D.R., Yaeger, P.C., McPherson, J.M., Tubo, R., 1998. Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J. Orthop. Res.* 16, 207–216.

Braun, T., Gratza, S., Becker, S., Schwentner, I., Stelter, K., Patscheider, M., Berghaus, A., Hempel, J.M., 2010. Auricular reconstruction with porous polyethylene frameworks: outcome and patient benefit in 65 children and adults. *Plast. Reconstr. Surg.* 126, 1201–1212.

Brent, B., 1980a. The correction of microtia with autogenous cartilage grafts: I. The classic deformity. *Plast. Reconstr. Surg.* 66, 1–12.

Brent, B., 1980b. The correction of microtia with autogenous cartilage grafts: II. Atypical and complex deformities. *Plast. Reconstr. Surg.* 66, 13–21.

Brown, A.N., Kim, B.-S., Alsberg, E., Mooney, D.J., 2000. Combining chondrocytes and smooth muscle cells to engineer hybrid soft tissue constructs. *Tissue Eng.* 6, 297–305.

Burghartz, M., Gehrke, T., Storck, K., Staudenmaier, R., Mandlik, V., Schurr, C., Hoang, N., Hagen, R., Kleinsasser, N., 2015. Vascularization of engineered cartilage constructs in a mouse model. *Cell Tissue Res.* 359, 479–487.

Buschmann, M.D., Grodzinsky, A.J., 1995. A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics. *J. Biomech. Eng.* 117, 179–192.

Cao, Y., Rodriguez, A., Vacanti, M., Ibarra, C., Arevalo, C., Vacanti, C.A., 1998. Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J. Biomater. Sci.* 9, 475–487.

Cao, Y., Vacanti, J.P., Paige, K.T., Upton, J., Vacanti, C.A., 1997. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast. Reconstr. Surg.* 100, 297–302.

Cenzi, R., Farina, A., Zuccarino, L., Carinci, F., 2005. Clinical outcome of 285 Medpor grafts used for craniofacial reconstruction. *J. Craniofac. Surg.* 16, 526–530.

Chang, S.C., Rowley, J.A., Tobias, G., Genes, N.G., Roy, A.K., Mooney, D.J., Vacanti, C.A., Bonassar, L.J., 2001. Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants. *J. Biomed. Mater. Res.* 55, 503–511.

- Chen, G., Sato, T., Ushida, T., Ochiai, N., Tateishi, T., 2004. Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen. *Tissue Eng.* 10, 323–330.
- Chen, J.-L., Duan, L., Zhu, W., Xiong, J., Wang, D., 2014a. Extracellular matrix production in vitro in cartilage tissue engineering. *J. Transl. Med.* 12, 88.
- Ciorba, A., Martini, A., 2006. Tissue engineering and cartilage regeneration for auricular reconstruction. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 70, 1507–1515.
- Cox, T.C., Camci, E.D., Vora, S., Luquetti, D.V., Turner, E.E., 2014. The genetics of auricular development and malformation: new findings in model systems driving future directions for microtia research. *Eur. J. Med. Genet.* 57, 394–401.
- Cronin, T.D., 1966. Use of a silastic frame for total and subtotal reconstruction of the external ear: preliminary report. *Plast. Reconstr. Surg.* 37, 399–405.
- Curran, J.M., Chen, R., Hunt, J.A., 2006. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. *Biomaterials* 27, 4783–4793.
- Dalby, M.J., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M.O., Herzyk, P., Wilkinson, C.D.W., Oreffo, R.O.C., 2007. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat. Mater.* 6, 997–1003.
- De Franceschi, L., Grigolo, B., Roseti, L., Facchini, A., Fini, M., Giavaresi, G., Tschon, M., Giardino, R., 2005. Transplantation of chondrocytes seeded on collagen-based scaffold in cartilage defects in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res. A* 75, 612–622.
- Elisseeff, J., McIntosh, W., Fu, K., Blunk, B.T., Langer, R., 2001. Controlled-release of IGF-I and TGF-beta1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering. *J. Orthop. Res.* 19, 1098–1104.
- Elowsonn, L., Kirsebom, H., Carmignac, V., Mattiasson, B., Durbeeja, M., 2013. Evaluation of macroporous blood and plasma scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomater. Sci.* 1, 402–410.
- Gallego, L., Junquera, L., García, E., García, V., Álvarez-Viejo, M., Costilla, S., Fresno, M.F., Meana, Á., 2010a. Repair of rat mandibular bone defects by alveolar osteoblasts in a novel plasma-derived albumin scaffold. *Tissue Eng. Part A* 16, 1179–1187.
- Gallego, L., Junquera, L., Meana, A., Alvarez-Viejo, M., Fresno, M., 2010b. Ectopic Bone Formation from Mandibular Osteoblasts Cultured in a Novel Human Serum-derived Albumin Scaffold. *J. Biomater. Appl.* 25, 367–381.
- Gallego, L., Pérez-Basterrechea, M., García-Consuegra, L., Álvarez-Viejo, M., Megías, J., Novoa, A., Costilla, S., Meana, Á., Junquera, L., 2015. Repair of segmental mandibular bone defects in sheep using bone marrow stromal cells and autologous serum scaffold. A pilot study. *J. Clin. Periodontol.*
- Green, W.T., Dickens, D.R., 1972. Culture model for investigation of cartilage matrix formation. *Surg. Forum* 23, 453–455.

- Grigolo, B., Roseti, L., Fiorini, M., Fini, M., Giavaresi, G., Aldini, N.N., Giardino, R., Facchini, A., 2001. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials* 22, 2417–2424.
- Hansen, U., Schünke, M., Domm, C., Ioannidis, N., Hassenpflug, J., Gehrke, T., Kurz, B., 2001. Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering. *J. Biomech.* 34, 941–949.
- Hu, J.C., Athanasiou, K.A., 2006. The effects of intermittent hydrostatic pressure on self-assembled articular cartilage constructs. *Tissue Eng.* 12, 1337–1344.
- Hunter, C.J., Levenston, M.E., 2004. Maturation and integration of tissue-engineered cartilages within an in vitro defect repair model. *Tissue Eng.* 10, 736–746.
- Isogai, N., Asamura, S., Higashi, T., Ikada, Y., Morita, S., Hillyer, J., Jacquet, R., Landis, W.J., 2004. Tissue engineering of an auricular cartilage model utilizing cultured chondrocyte-poly (L-lactide- ϵ -caprolactone) scaffolds. *Tissue Eng.* 10, 673–687.
- Johnson, T.S., Xu, J.-W., Zaporozhan, V.V., Mesa, J.M., Weinand, C., Randolph, M.A., Bonassar, L.J., Winograd, J.M., Yaremchuk, M.J., 2004. Integrative repair of cartilage with articular and nonarticular chondrocytes. *Tissue Eng.* 10, 1308–1315.
- Kamil, S.H., Rodriguez, A., Vacanti, C.A., Eavey, R.D., Vacanti, M.P., 2004. Expansion of the number of human auricular chondrocytes: recycling of culture media containing floating cells. *Tissue Eng.* 10, 139–144.
- Kaufman, M.R., Tobias, G.W., 2003. Engineering cartilage growth and development. *Clin. Plast. Surg.* 30, 539–546.
- Kim, G., Okumura, M., Bosnakovski, D., Ishiguro, T., Kadosawa, T., Fujinaga, T., 2004. Regeneration of cartilage tissue by autologous chondrocytes transplantation for cartilage defects in a experimental bovine model. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 66, 263–267.
- Legendre, F., Ollitrault, D., Hervieu, M., Baugé, C., Maneix, L., Goux, D., Chajra, H., Mallein-Gerin, F., Boumediene, K., Galera, P., Demoor, M., 2013. Enhanced hyaline cartilage matrix synthesis in collagen sponge scaffolds by using siRNA to stabilize chondrocytes phenotype cultured with bone morphogenetic protein-2 under hypoxia. *Tissue Eng. Part C Methods* 19, 550–567.
- Lu, L., Peter, S.J., Lyman, M.D., Lai, H.L., Leite, S.M., Tamada, J.A., Vacanti, J.P., Langer, R., Mikos, A.G., 2000. In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams. *Biomaterials* 21, 1595–1605.
- Lynch, J.B., Pousti, A., Doyle, J.E., Lewis, S.R., 1972. Our experiences with silastic ear implants. *Plast. Reconstr. Surg.* 49, 283–285.
- Maroudas, A., Bullough, P., 1968. Permeability of articular cartilage. *Nature* 219, 1260–1261.
- Mizuno, H., Zuk, P.A., Zhu, M., Lorenz, H.P., Benhaim, P., Hedrick, M.H., 2002. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 109, 199–209.

- Mohan, N., Nair, P.D., 2010. A synthetic scaffold favoring chondrogenic phenotype over a natural scaffold. *Tissue Eng. Part A* 16, 373–384.
- Moran, J.M., Pazzano, D., Bonassar, L.J., 2003. Characterization of polylactic acid-polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* 9, 63–70.
- Nagata, S., 1993. A new method of total reconstruction of the auricle for microtia. *Plast. Reconstr. Surg.* 92, 187–201.
- Naumann, A., Dennis, J.E., Aigner, J., Coticchia, J., Arnold, J., Berghaus, A., Kastenbauer, E.R., Caplan, A.I., 2004. Tissue engineering of autologous cartilage grafts in three-dimensional in vitro macroaggregate culture system. *Tissue Eng.* 10, 1695–1706.
- Nöth, U., Rackwitz, L., Heymer, A., Weber, M., Baumann, B., Steinert, A., Schütze, N., Jakob, F., Eulert, J., 2007. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. A* 83, 626–635.
- Oh, S.H., Park, I.K., Kim, J.M., Lee, J.H., 2007. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials* 28, 1664–1671.
- Osguthorpe, J.D., 1991. Head and neck burns. Evaluation and current management. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 117, 969–974.
- Peretti, G.M., Xu, J.-W., Bonassar, L.J., Kirchhoff, C.H., Yaremchuk, M.J., Randolph, M.A., 2006. Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Eng.* 12, 1151–1168.
- Porter, C.J.W., Tan, S.T., 2005. Congenital auricular anomalies: topographic anatomy, embryology, classification, and treatment strategies. *Plast. Reconstr. Surg.* 115, 1701–1712.
- Pörtner, R., Nagel-Heyer, S., Goepfert, C., Adamietz, P., Meenen, N.M., 2005. Bioreactor design for tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 235–245.
- Rotter, N., Tobias, G., Lebl, M., Roy, A.K., Hansen, M.C., Vacanti, C.A., Bonassar, L.J., 2002. Age-related changes in the composition and mechanical properties of human nasal cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.* 403, 132–140.
- Scherer, K., Schünke, M., Sellckau, R., Hassenpflug, J., Kurz, B., 2004. The influence of oxygen and hydrostatic pressure on articular chondrocytes and adherent bone marrow cells in vitro. *Biorheology* 41, 323–333.
- Sekiya, I., Colter, D.C., Prockop, D.J., 2001. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 411–418.
- Soukup, B., Mashhadi, S.A., Bulstrode, N.W., 2012. Health-related quality-of-life assessment and surgical outcomes for auricular reconstruction using autologous costal cartilage. *Plast. Reconstr. Surg.* 129, 632–640.
- Staffenberg, D.A., 2003. Microtia repair. *J. Craniofac. Surg.* 14, 481–486.

- Steffen, A., Klaiber, S., Katzbach, R., Nitsch, S., Frenzel, H., Weerda, H., 2007. [Epidemiology of auricular trauma]. *Handchir. Mikrochir. Plast.* 39, 98–102.
- Steffen, A., Klaiber, S., Katzbach, R., Nitsch, S., König, I.R., Frenzel, H., 2008. The psychosocial consequences of reconstruction of severe ear defects or third-degree microtia with rib cartilage. *Aesthetic Plast. Surg.* 28, 404–411. d
- Stoddart, M.J., Grad, S., Eglin, D., Alini, M., 2009. Cells and biomaterials in cartilage tissue engineering. *Regen. Med.* 4, 81–98.
- Storck, K., Staudenmaier, R., Buchberger, M., Strenger, T., Kreutzer, K., von Bomhard, A., Stark, T., 2014. Total reconstruction of the auricle: our experiences on indications and recent techniques. *BioMed Res. Int.* 2014, 373286.
- Tanzer, R.C., 1959. Total reconstruction of the external ear. *Plast. Reconstr. Surg.* 23, 1–15.
- Thompson, E.M., Matsiko, A., Kelly, D.J., Gleeson, J.P., O'Brien, F.J., 2016. An Endochondral Ossification-Based Approach to Bone Repair: Chondrogenically Primed Mesenchymal Stem Cell-Laden Scaffolds Support Greater Repair of Critical-Sized Cranial Defects Than Osteogenically Stimulated Constructs In Vivo. *Tissue Eng. Part A* 22, 556–567.
- Tollefson, T.T., 2006. Advances in the treatment of microtia. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 14, 412–422.
- Vacanti, C.A., Langer, R., Schloo, B., Vacanti, J.P., 1991. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast. Reconstr. Surg.* 88, 753–759.
- Waldman, S.D., Couto, D.C., Grynepas, M.D., Pilliar, R.M., Kandel, R.A., 2006. A single application of cyclic loading can accelerate matrix deposition and enhance the properties of tissue-engineered cartilage. *Osteoarthr.* 14, 323–330.
- Warren, S.M., Fong, K.D., Chen, C.M., Lobo, E.G., Cowan, C.M., Lorenz, H.P., Longaker, M.T., 2003. Tools and techniques for craniofacial tissue engineering. *Tissue Eng.* 9, 187–200.
- Webb, K., Hlady, V., Tresco, P.A., 1998. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. *J. Biomed. Mater. Res.* 41, 422–430.
- Wilkes, G.H., Wolfaardt, J.F., 1994. Osseointegrated alloplastic versus autogenous ear reconstruction: criteria for treatment selection. *Plast. Reconstr. Surg.* 93, 967–979.
- Yamane, S., Iwasaki, N., Kasahara, Y., Harada, K., Majima, T., Monde, K., Nishimura, S.-I., Minami, A., 2007. Effect of pore size on in vitro cartilage formation using chitosan-based hyaluronic acid hybrid polymer fibers. *J. Biomed. Mater. Res. A* 81, 586–593.
- Yanaga, H., Imai, K., Fujimoto, T., Yanaga, K., 2009. Generating Ears from Cultured Autologous Auricular Chondrocytes by Using Two-Stage Implantation in Treatment of Microtia: *Plast. Reconstr. Surg.* 124, 817–825.

Yang, Z., Shi, Y., Wei, X., He, J., Yang, S., Dickson, G., Tang, J., Xiang, J., Song, C., Li, G., 2009. Fabrication and repair of cartilage defects with a novel acellular cartilage matrix scaffold. *Tissue Eng. Part C Methods* 16, 865–876.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M.H., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228.