



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
SECRETARIA DE SALUD

HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZALEZ".

"DIFERENCIAS HISTOLÓGICO-MOLECULARES EN
CONDROCITOS CULTIVADOS A PARTIR DE TEJIDO GRASO Y
CARTÍLAGO AURICULAR EN EL MODELO ANIMAL"

TRABAJO O DE INVESTIGACION QUE PRESENTA EL
DR. LEONARDO ABARCA PÉREZ

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD EN;
CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA.

ASESOR DE TESIS:

DR. FERNANDO MOLINA MONTALVA

JULIO 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

A mis padres.

Gracias por el impulso a seguir siempre adelante y llevarme hasta donde me encuentro hoy.

A mis profesores.

Por el tiempo dedicado en mi formación como Cirujano Plástico y Reconstructivo

A mi tutor.

Por la oportunidad brindada para ingresar a este maravilloso mundo de la cirugía plástica, y confiar en mí.

A Julie y a Mónica.

Las llevo en el corazón eternamente. Gracias por ser mis ángeles.

A mis Amigos y hermanos

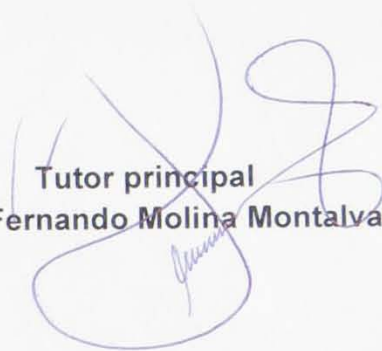
Sin ellos mi vida hubiera sido más vacía. Gracias

Este trabajo fue realizado en el Hospital General Dr. Manuel Gea González y en la Sección de Estudios de Postgrado e Investigación de bajo la Dirección del Dr. Fernando Molina Montalva.

Este trabajo de Tesis con No. 05-26-2012 , presentado por el alumno Leonardo Abarca Pérez se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Fernando Molina Montalva Montalva, y la División de Investigación Clínica a cargo de la Dra. Maria de Lourdes Suárez Roa y por con fecha del 28 de Julio del 2013 para su impresión final.

División de Investigación Clínica
Dra. Maria de Lourdes Suárez Roa

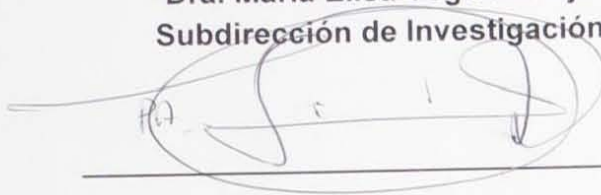
Tutor principal
Dr. Fernando Molina Montalva



Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de Enseñanza



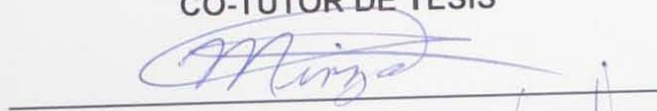
Dra. María Elisa Vega Memije
Subdirección de Investigación



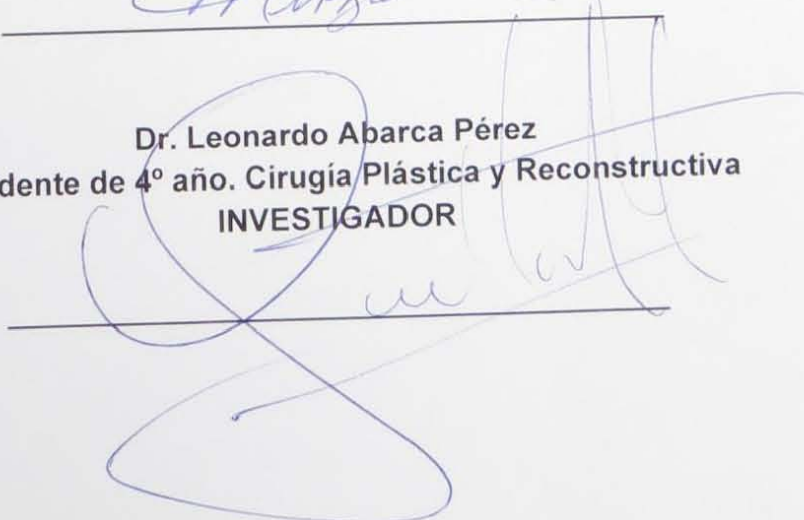
Dr. Fernando Molina Montalva
Jefe de la División de Cirugía Plástica y Reconstructiva
ASESOR DE TESIS



Dra. Mirza Romero Valdovinos
Investigador titular. Departamento de Biología Molecular
CO-TUTOR DE TESIS



Dr. Leonardo Abarca Pérez
Residente de 4º año. Cirugía Plástica y Reconstructiva
INVESTIGADOR



DIFERENCIAS HISTOLÓGICO-MOLECULARES EN CONDROCITOS CULTIVADOS A PARTIR
DE TEJIDO GRASO Y CARTÍLAGO AURICULAR EN EL MODELO ANIMAL

Colaboradores:

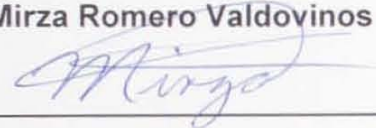
Nombre: Dr. Fernando Molina Montalva

Firma: _____



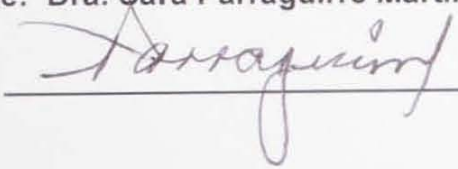
Nombre: Dra. Mirza Romero Valdovinos

Firma: _____



Nombre: Dra. Sara Parraguirre Martinez

Firma: _____



INDICE

Glosario	7
Relación de figuras y tablas	8
Resumen	14
Abstract	15
1. Introducción.....	16
2. Marco de Referencia	22
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivos	26
6. Metodología.....	27
7. Resultados	35
8. Discusión.....	39
9. Conclusiones.....	43
10. Perspectivas.....	44
11. Bibliografía	45
12. Anexos	49

GLOSARIO

Inducción condrogénica. Obtención de condrocitos a partir de otros tipos celulares y medios de cultivo especializados para condrogénesis

Tinción de Masson. Técnica de coloración especial que permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas para dar resistencia; también evidencia, aunque en menor intensidad, las fibras reticulares.

Tinción de PAS. Técnica que permite la tinción de componentes celulares que contienen hidratos de carbono

Glicosaminoglucanos. largas cadenas de polisacáridos no ramificadas formadas por la repetición sucesiva de la unidad de disacáridos formada por: ácido urónico y hexosamina acetilada, la cual puede estar sulfatada.

GADPH. Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogena

Tasa de Proliferación celular. Cantidad de aumento celular en un periodo de tiempo

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

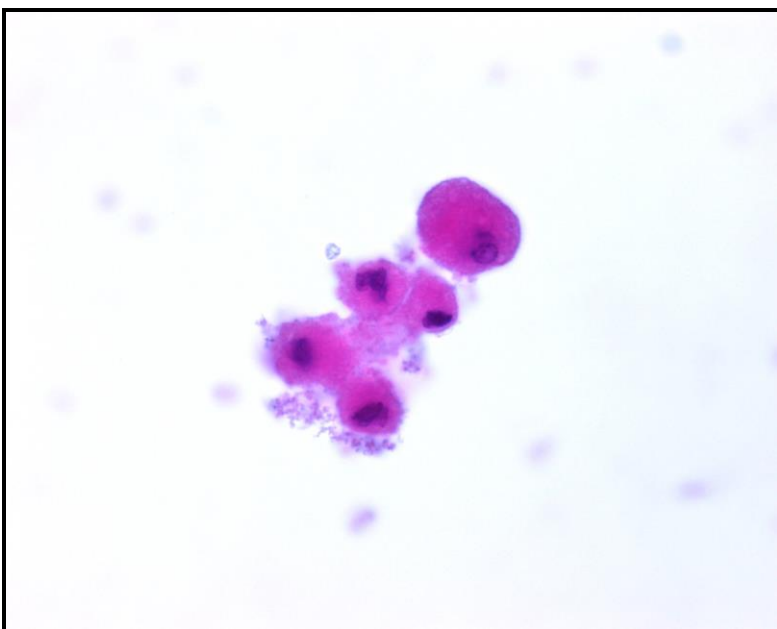


Figura 1. Transición grasa-cartílago (200 X, H&E).

Citología con grupo de células con citoplasma ligeramente basófilos y con ocasionales microvacuolas, núcleos irregulares periféricos. Los adipocitos muestran una coloración eosinófila con núcleos en la periferia, y de numerosas microvacuolas en el citoplasma. Los condrocitos presentan núcleos centrales, con una importante ganancia de cromatina y ácidos nucleicos lo que les da el aspecto basófilo a la tinción con H y E. Las microvacuolas han desaparecido.

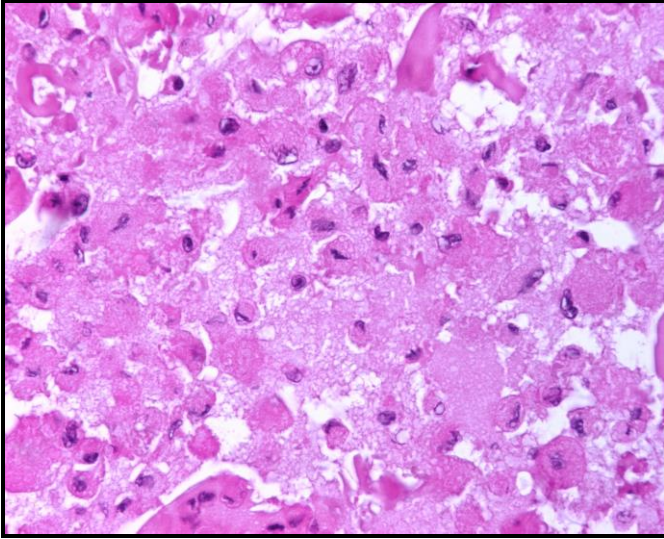


Figura 2. Bloque de células diferenciadas a cartílago (100 x, H&E).

Numerosas células dispuestas en grupos y láminas inmersas en matriz acelular se observaron células con diferenciación condroide, con forma ovoidea, núcleos centrales teñidos intensamente basófilo y pérdida de las características de adipocitos.

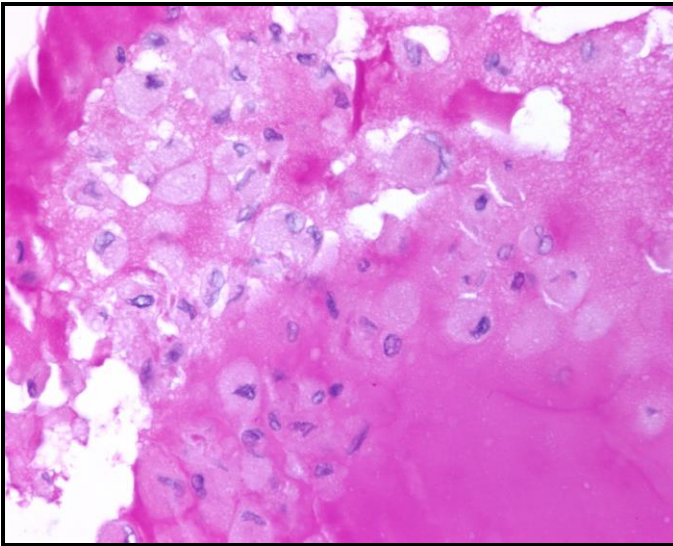


Figura 3. Bloque de células diferenciadas a cartílago. (400 X). Tinción de PAS. Células agrupadas con hiperchromia nuclear y escaso contenido citoplasmático. Separación clara entre los elementos celulares y la matriz La matriz extracelular teñida intensamente de coloración rosa-magenta por la abundante presencia de proteoglicanos.

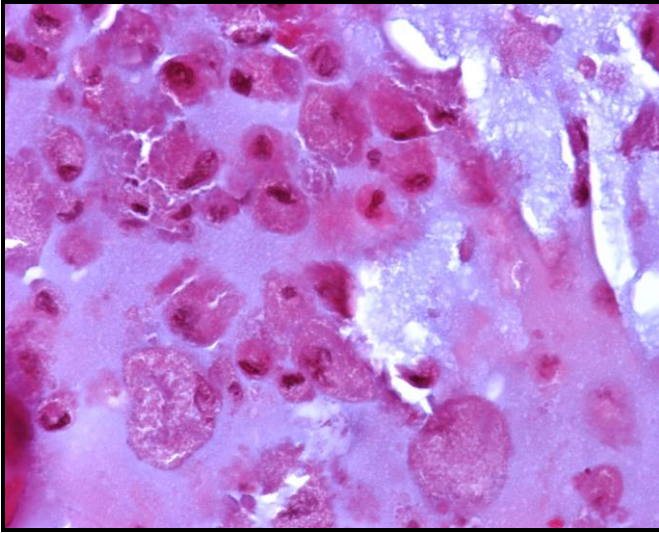


Figura 4. Bloque de células diferenciadas a cartílago (400 X, Masson).

Células diferenciadas a cartílago que muestran núcleos hipercromáticos irregulares que están inmersos en una matriz acelular de color azul claro con patrón mixocondroide por las fibras de colágena. Estos datos sugieren diferenciación a cartílago hialino.

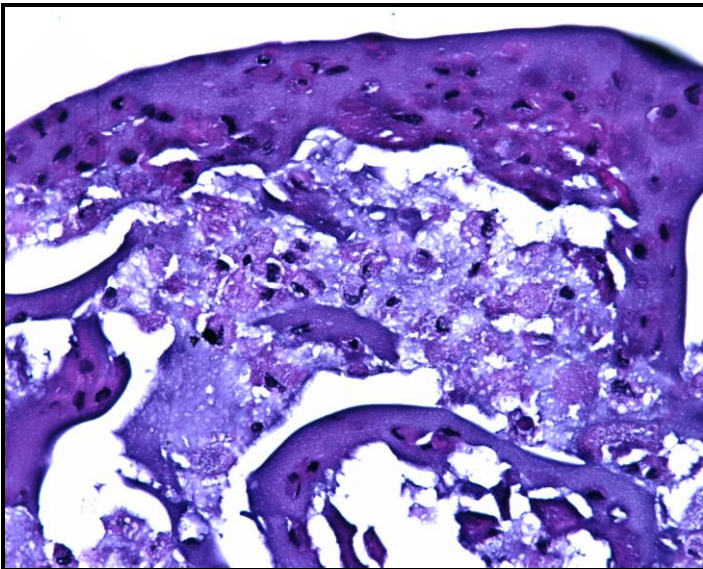


Figura 5. Bloque celular de células diferenciadas a cartílago (400 X, Fibras Elásticas).

Grupos celulares y matriz con ausencia de fibras elásticas. Descartando el cartílago elástico.

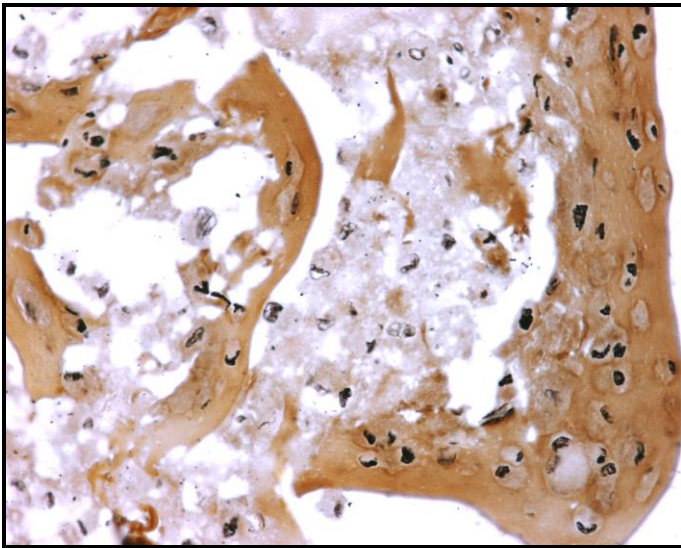


Figura 6. Bloque de células diferenciadas a cartílago. (400 X, Retículo).
Grupos celulares y matriz con ausencia de fibras reticulares en forma de depósitos. Lo que lo define negativo para fibrocartílago.

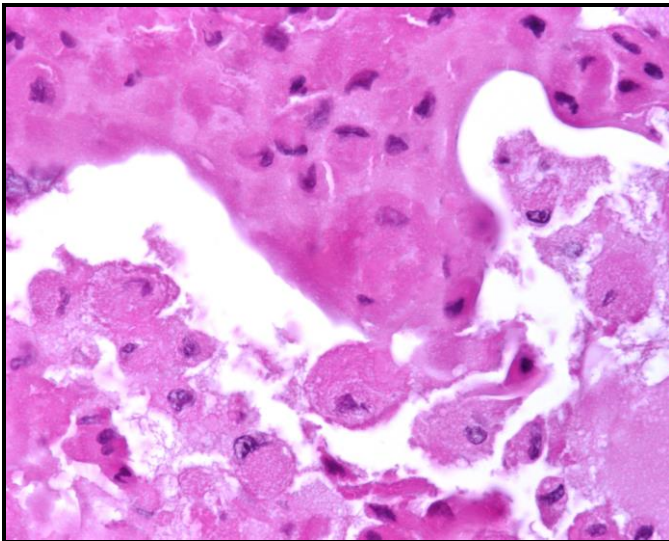


Figura 7. Bloque de condrocitos en expansion. (400 X).
Tinción H&E. Condrocitos auriculares como grupos celulares pequeños con núcleos centrales teñidos basófilos y un citoplasma claro y homogéneo dispersas en una matriz extracelular

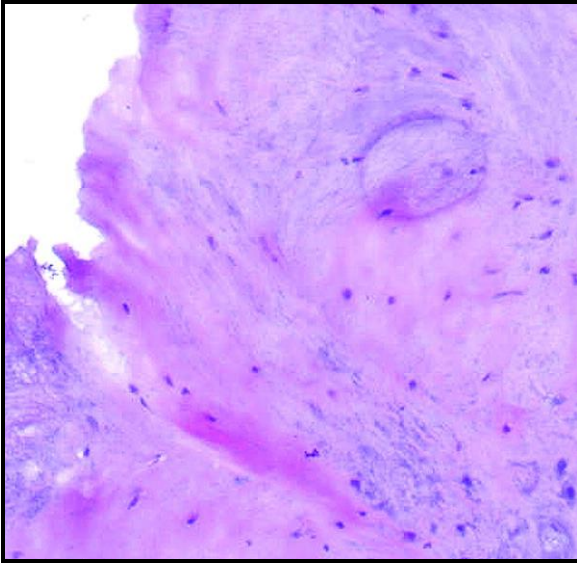


Figura 8. Bloque celular de condrocitos en expansion. (400 X, Masson). Tinción de Masson. Acúmulos celulares en una matriz extracelular heterogénea tipo mixocondroide con captación moderada de la tinción por presencia de fibras de colágena.

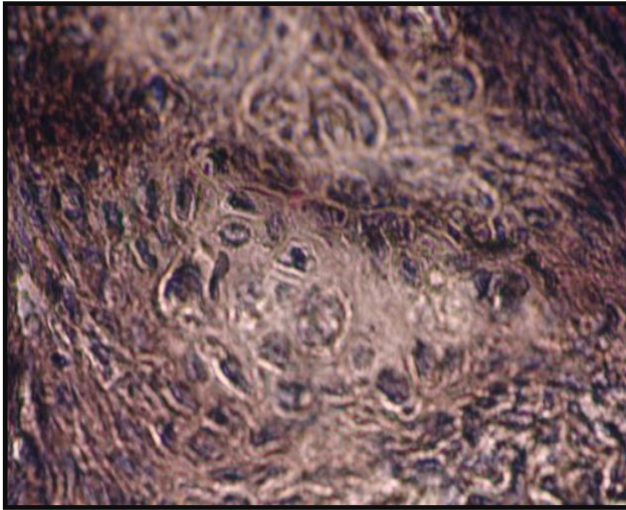


Figura 9. Bloque celular de condrocitos en expansion. (100 X). Tinción de Fibras elásticas. Matriz extracelular teñida de forma moderada de un color pardo-negro, aspecto heterogéneo debido a la presencia moderada de fibras elásticas

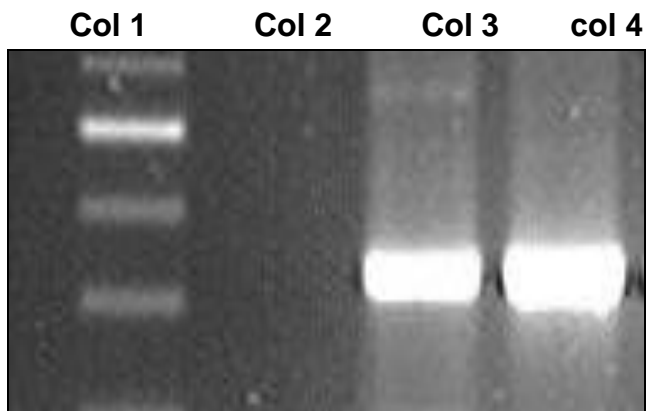


Figura 10. RT-PCR para colágena tipo II

Columna 1, marcador de peso molecular

Columna 2. Grasa no diferenciada

Columna 3. Cultivo de condrocitos de oreja

Columna 4 tejido adiposo diferenciado

RESUMEN

Las técnicas quirúrgicas actuales pueden limitar al cirujano en reconstruir en defectos importantes de tejidos blandos. Para reconstruir defectos o pérdidas de tejido cartilaginoso ha sido necesario incursionar en otras alternativas. Con técnicas de ingeniería tisular se ha logrado cultivar condrocitos a partir de células madre con medios de inducción condrogénica.

La intención de este estudio es lograr tipificar la subpoblación de cartílago después de la inducción condrogénica de los adipocitos, al mismo tiempo que tipificar la subpoblación de los condrocitos expandidos en cultivo in vitro con cartílago auricular determinando sus características después de lograr su expansión.

Metodología. Se obtuvieron adipocitos de la región inguinal y cartílago auricular de la oreja de la rata. Se sometieron las células obtenidas en medio de diferenciación condrogénica para los adipocitos y medio DMME para el cartílago auricular por 8 semanas.

Posteriormente se realizaron preparaciones histológicas para diferentes tinciones así como extracción de RNA para determinar proteínas de colágena.

Resultados. El análisis histológico y morfológico de la célula y la composición de glucoproteínas y de fibras de colágeno de los condrocitos diferenciados junto con la negatividad para fibras elásticas y reticulares lo hacen compatible con cartílago hialino; mientras que los condrocitos obtenidos por expansión de cartílago auricular presentan una morfología más compatible con cartílago elástico.

Conclusiones. El cartílago hialino obtenido en estos cultivos tiene las características ideales para ser empleado en la reconstrucción de estructuras craneofaciales, como nariz y placa tarsal. Característicamente todas estas estructuras poseen un cartílago hialino con moderada resistencia y maleabilidad, por lo que para su reconstrucción pueden utilizarse el tejido cartilaginoso obtenido desde grasa.

ABSTRACT

Molecular and histological differences in cultured chondrocytes differentiated from adipose tissue and auricular cartilage in an animal model.

Current surgical techniques may limit the surgeon to reconstruct major defects of soft tissue. To reconstruct defects or loss of cartilage has been necessary to venture into other alternatives. With tissue engineering techniques has grown chondrocytes from stem cells with chondrogenic induction media. The aim of this study is to characterize the subpopulation of cartilage after chondrogenic induction of adipocytes, at the same time characterize chondrocytes and expand them in vitro culture, determining ear cartilage after achieving their expansion.

Methodology. Adipocytes were obtained from the groin and ear cartilage from the ear of the rat. In the midst of chondrogenic differentiation to adipocytes and half to the ear cartilage DMME for 8 weeks.

Later histological preparations were made for different staining and RNA extraction to determine protein collagen.

Results. Histological and morphological analysis of the cell and the composition of glycoproteins and collagen fibers differentiated chondrocytes with negativity for elastic and reticular fibers make it compatible with hyaline cartilage, whereas chondrocytes obtained by expansion of auricular cartilage have a morphology more consistent with elastic cartilage.

Conclusions. The hyaline cartilage obtained in these cultures has the ideal characteristics for use in the reconstruction of craniofacial structures, such as nose and tarsal plate. Typically these structures have a hyaline cartilage with moderate strength and malleability, so these can be used for rebuilding cartilage tissue obtained from fat.

1. INTRODUCCION

La pérdida tisular es uno de los mayores retos a los que el cirujano plástico se enfrenta. Técnicas reconstructivas con tejido autólogo han sido descritas, sin embargo no siempre es posible emplear tejido donador suficiente y en ocasiones dejar defectos del sitio donador. Por otra parte la utilización de tejido heterólogo tiene el inconveniente de necesitar inmunosupresión para evitar el rechazo.

Actualmente, el trasplante autólogo, se ha convertido en el estándar de oro para la reconstrucción de tejidos para una serie de patologías que involucran pérdida tisular, entre las que se encuentran las malformaciones congénitas, traumatismos, resecciones oncológicas, y quemaduras con reparación de músculo, hueso y cobertura cutánea.}

Los principales inconvenientes del trasplante autólogo son: el riesgo quirúrgico, dificultad técnica y la morbilidad del área donadora (1). Posteriormente el desarrollo de prótesis con materiales aloplásticos como el teflón, silicón y otros, surgieron como una alternativa sin embargo con múltiples inconvenientes como rechazo, exposición e infección, por lo que actualmente su uso es limitado.

Uno de los tejidos más utilizados en cirugía plástica y reconstructiva es el cartílago; empleado para la reconstrucción auricular, nasal, de los párpados y en el enoftalmos en cabeza y cuello. En la mano, para el tratamiento de la degeneración articular. En el tórax para recuperar el contorno en hundimientos y ocasionalmente para los pezones en la reconstrucción mamaria. En microcirugía, una reconstrucción traqueal requiere necesariamente de anillos cartilaginosos. (2, 3)

El cartílago es un tejido especializado compuesto por condrocitos embebidos en una matriz extracelular compuesta primariamente por proteoglicanos (PGs), agua y colágena. Su vascularidad es limitada, por lo que su capacidad regenerativa es menor (2). Lo que se traduce en tejido cicatrizal en vez de regeneración en caso de lesión cartilaginosa (4). La nutrición del cartílago a través de difusión, lo que permite que el cartílago pueda ser transferido de un sitio a otro, pudiendo ser tallado y moldeado, como en la reconstrucción auricular y facial (5, 6).

Al análisis histológico, el cartílago es un material bifásico, con una matriz sólida que consiste en una red de colágena densa suspendida en un gel de Proteoglicanos (PG) y una fase fluida intersticial. Los condrocitos componen menos del 5% del volumen del cartílago. Esta célula secreta continuamente

moléculas extracelulares incluyendo colágena, glicosaminoglicanos (GAG) y elastina; las cuales se relacionan con las características biomecánicas del tejido. Al proliferar los condrocitos, se envuelven en una matriz multilaminada y forman una unidad denominada condrón.

La matriz interterritorial del condrón es rica en colágena así como en Proteoglicanos, los cuáles imparten características mecánicas al cartílago, representados principalmente por el aggrecan, que contiene cadenas de polisacáridos que reaccionan con la tinción de safranin-O. El tipo predominante de colágena en cartílago elástico y hialino es el tipo II con cantidades menores de tipo I, VI, tipo IX, tipo XI y otros. En el fibrocartílago, la colágena predominante es tipo I (hasta 90%), con menor cantidad de tipo II, tipo III y tipo V. Otras proteínas como la elastina encontrada en el cartílago elástico, en combinación con la colágena, son capaces de sostener la tensión. La organización de la matriz se relaciona con las características fisiológicas del tejido. El cartílago articular es importante para la lubricación y resistencia; el intervertebral absorbe los impactos, transfiriendo la fuerza de un vector axial a tangencial; los cartílagos de tráquea, oreja, nariz, faringe y costillas mantienen la forma, dan resistencia y proveen flexibilidad.(2)

El cartílago puede ser dividido en subpoblaciones dependiendo de la composición de la matriz y de su papel biológico en el cuerpo.

Cartílago hialino. Tejido conjuntivo duro, cubierto por pericondrio como en orejas y nariz, excepto en extremos articulares. Con una matriz extracelular compleja dispuesta en líneas concéntricas, compuesta principalmente de fibras de colágena tipo II, escasas fibras elásticas. La sustancia fundamental constituida por proteoglicanos: Glucosaminglucanos sulfatados unidos a proteínas diferentes de colágena, especialmente condroitin sulfato. Se encuentra presente en las costillas, laringe, tráquea, bronquios, superficie articular de los huesos. La rigidez de la matriz está dada por las uniones entre el colágeno, ácido hialurónico y proteoglicanos. Mientras que la elasticidad se deba a su alto contenido en agua. El cartílago hialino podemos clasificarlo en:

Cartílago no articular. Fosas nasales, cartílago tiroideo, anillos traqueales, bronquios, incursión esternal de las costillas.

Cartílago articular. En todas las articulaciones móviles.

Fibrocartílago. Consiste en una mezcla de tejido fibroso y tejido cartilaginoso. Este cartílago además de contener colágena tipo II, tiene como característica principal la presencia de colágena tipo I. Se encuentra en: sínfisis del pubis, anillos de discos intervertebrales, y en algunos ligamentos, meniscos y articulación temporomandibular (ATM). Este se deriva de zonas de tejido conectivo denso y

cuenta con una matriz intercelular compuesta por sustancia fundamental amorfa rica en glucosaminoglucanos sulfatados. (condroitin sulfatado) y también por fibras reticulares.

Cartílago elástico. Tejido conectivo con características histológicas son similares al cartílago hialino. Por lo que aparte de la colagena tipo II contiene muchas fibras elásticas sobre una matriz sólida, las cuáles se ramifican y dan la flexibilidad característica del cartílago. Se encuentra presente en el oído externo, laringe, trompas de eustaquio y epiglotis. Este tipo de cartílago contiene redes de fibras elásticas y fibras de colágena. Y como proteína principal la elastina. Empleando la tinción de Voerfoeff, podemos ver las fibras de elastina teñidas de color púrpura oscuro/negro.

Reconstrucción cartilaginosa.

Las zonas donadoras de cartílago autólogo para reconstrucción son: el cartílago auricular, septal, costal y cartílago articular de zonas no comprometidas. El cartílago fresco autólogo es capaz de sobrevivir fácilmente a los procedimientos de transplante con una baja tasa de reabsorción a través del tiempo (2,4). En general, la mayor zona donadora de cartílago es el costal. Este cartílago es maleable y fácilmente moldeable (6). La concha auricular y el septum cartilaginosa nasal son otras zonas de uso común en rinoplastia reconstructiva y estética, reconstrucción de órbita y pezón (7).

El transplante de cartílago alogénico se usó en la primera mitad del siglo XX (2), sin embargo estudios posteriores demostraron que a pesar de que los condrocitos se encuentran en un ambiente privilegiado inmunológicamente, protegidos por la matriz extracelular, la celularidad de los injertos disminuye progresivamente, y a largo plazo todos los aloinjertos de cartílago se reabsorben significativamente (8). Aunque no hay casos reportados de transmisión de VIH asociados a aloinjertos de cartílagos, no se recomienda el uso de aloinjertos de cartílago (9). Estas limitantes colocan al transplante autólogo como el candidato ideal para la obtención de cartílago, sin embargo la limitación cuantitativa de los sitios donadores y la morbilidad asociada a la obtención, nos obligan a buscar nuevas soluciones.

Algunos de los abordajes más promisorios para la reconstrucción tisular y la reparación del cartílago es el uso de ingeniería tisular para generar nuevo tejido cartilaginosa (1,10). La Terapia Celular se ha definido como “El trasplante de células vivas a un organismo con el propósito de reparar un tejido o funciones perdidas”. A su vez, la Medicina Regenerativa se ha definido como “un área multidisciplinaria emergente que busca el mantenimiento, la mejora o la restauración de la función de células, tejidos y órganos, mediante la aplicación de

métodos relacionados con la Terapia y la Ingeniería Tisular” (10) .

Las células madre se han utilizado en Terapia Celular y Medicina Regenerativa como agentes terapéuticos por su capacidad para diferenciarse en células específicas para la reparación de grupos de células o de tejidos que han sufrido algún daño. (11)

Actualmente, se utilizan diversas estrategias para la aplicación de estas células: a) implantación directa de células troncales para la construcción de nuevas estructura, b) implantación de células troncales preinducidas para que sigan una línea de diferenciación concreta y c) estimulación de células endógenas para que ellas mismas puedan sustituir las estructuras dañadas (6, 10). El primer caso consiste en la administración directa de células madre al paciente de tal manera que estas colonicen el punto adecuado del cuerpo y se logren diferenciar continuamente en el tipo celular deseado. El segundo caso se trata de trasplante de células, tejido u órganos procedentes del cultivo de células diferenciadas derivadas de células troncales. Estas pueden ser cultivadas y dirigidas hacia la diferenciación en determinados tipos celulares en el laboratorio para posteriormente ser trasplantadas, como las células musculares cardíacas para tratar insuficiencias cardíacas. Las fuentes para cada tipo celular diferenciado pueden ser células madre embrionarias o adultas, incluidas las propias células del paciente. El tercer caso corresponde al estímulo de células madre endógenas mediante factores de inducción. (12, 13) Este abordaje terapéutico se basa en la posibilidad de inducir la autoreparación de tejidos u órganos dañados estimulando la población de células madre propias de un individuo, mediante la administración, por ejemplo, de factores de crecimiento, citocinas, receptores y segundos mensajeros que poseen la capacidad de generar eventos regenerativos en las células, y su crecimiento (14).

La investigación en células madres mesenquimatosas de médula ósea capaces de ser estimuladas para diferenciarse en líneas condrogénicas, osteogénicas, neurogénicas y otras; y el uso de células progenitoras multilinaje obtenidas de tejido graso lipoaspirado son rutas prometedoras para obtener cartílago con menor morbilidad en el sitio donador que el uso de cartílago autólogo (1,14-17). En la actualidad, múltiples grupos han logrado aislar células madres mesenquimatosas de tejido lipoaspirado procesado (PLA) y diferenciarlas a estructuras cartilaginosas. (18)

Otra alternativa en la ingeniería tisular del cartílago es la de obtener una muestra pequeña de condrocitos de cartílago no comprometido. Estas células pueden crecer *in vitro*, y al tener una cantidad suficiente, combinarse con un andamio o polímero biológicamente compatible, y ser trasplantado en el sitio deseado para restaurar la función (2). Este abordaje ha sido probado en modelos animales, y

recientemente en humanos y ya ha alcanzado aplicaciones clínicas (13-15). Después de comprobar por características histológicas la presencia de proteínas de matriz extracelular (GAGs y PGs), así como presencia de colágena tipo I y II, elastina y fibras reticulares. (15-16) Esto se ha logrado reproducir en nuestro laboratorio por los medios de inducción condrogénica reportados. (16)

Tanto el tejido adiposo como la médula ósea son fuentes atractivas para la inducción condrogénica de células madre, debido a su abundancia en el organismo y capacidad de cultivarse. Sin embargo es más sencillo, seguro y factible la recolección de células del tejido adiposo. Adicionalmente, no existe un consenso que otorgue mayor beneficio a un grupo celular sobre del otro para inducción condrogénica. Con diferencias mínimas o ninguna a favor de las células madre derivadas de la médula ósea.

En un estudio se demostró que la inducción condrogénica conduce a un aumento en la síntesis de los Glucosaminoglucanos (GAG) que componen la matriz en las Células madre derivadas de adipocitos (hasta 6 veces) después de 4 semanas, acompañado de un aumento de la detección de la proteína colagena II a las 3 semanas, (15)

Con estos antecedentes se han realizados estudios sobre los puntos estructurales y bioquímicos implicados en la proliferación, diferenciación y crecimiento de los condrocitos normales en los cultivos de ingeniería tisular con diferentes tipos de cartílago (oreja, articular, costilla). (12-14) Estos trabajos ha demostrado que las células responden y se adaptan en caminos diferentes durante su proliferación y crecimiento hacia un neo cartílago.

Inducción de Condrogénesis

Los tres puntos clave para la medicina regenerativa y cirugía son las señales inductoras como las proteínas morfogenéticas y factores de inducción, células respondedoras y un andamio de matriz extracelular. Las células madre tienen la capacidad de desarrollarse hacia diferentes tipos celulares y han sido una alternativa para la reparación de cartílago con condrocitos autólogos.

En 1998 se describió que las células madres de la médula espinal (BMSC) tienen la capacidad de ser inducidas hacia condrocitos. (17) En el 2001, fue reportado el potencial condrogénico de las células madre del tejido adiposo (ADSC), así como de las características multipotenciales. (18) Esta diferenciación abrió el panorama de oportunidades para el tratamiento de lesiones del tejido musculoesquelético. Estudios que investigaron la condrogénesis *in vitro* a partir de Células madre mesenquimatosas (MSCs), demostraron la expresión de aggrecan y colágena tipo

II en cultivos de células madre. (20) Posteriormente en un estudio *in vivo*, se crearon defectos osteocondrales en conejos, donde se implantaron MSCs. (21)

Existen factores bioactivos que son esenciales para la proliferación y diferenciación de las MSCs en la vía condrogénica. Existiendo ya factores de crecimiento definidos para la inducción de la condrogénesis de MSC. (18) El factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β) estimula la expresión de colágeno tipo II y proteoglicanos en MSC, que responden al TGF- β 1 de forma dosis dependiente. Mientras que el Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) puede estimular la síntesis de matriz extracelular por lo MSCs. (20) En la descripción de Fromigue (21), que trabajo con células estromales de médula ósea femoral, la administración de TGF β 2 indujo el aumento en la síntesis de colágena tipo I. Por su parte, Worster (22) encontró que la inducción de TGF β 2 y 3 son efectivas en promover la condrogénesis de células madre mesenquimatosas, logrando acumular mayor cantidad de GAG, y Colágena tipo II Integrando una combinación de factores efectiva en la proliferación condrogénica de células madre. (23)

Con estos avances y su auge en la aplicación clínica, se ha evaluado y comparado la seguridad, eficacia de las células diferenciadas de células mesenquimatosas de Médula ósea (BMSC) con los condrocitos normales. Con la intención de descartar cambios desfavorables, como degeneración celular. Ya que se ha descrito que la calidad de las células derivadas de Células madre inducidas es discretamente menor comparada con los condrocitos normales. (24-25)

La reciente incursión de la microscopia atómica se ha podido estudiar las propiedades bioquímicas de las células. Chiang y su grupo (11) estudiaron las propiedades bioquímicas de las BMSC diferenciadas a condrocitos versus condrocitos normales. En este estudio se demostró que las MSC tienen una gran fuerza de adhesión y pueden ser firmemente retenidas en el huésped después de la implantación autóloga de tejido.

2. MARCO DE REFERENCIA.

En 1998 Johnstone (17) describió en un modelo in vitro la capacidad de diferenciar células madre de la médula espinal de conejos hacia condrocitos con factores de inducción condrogénica compuesto principalmente por TGF Beta 1 y dexametasona. En sus resultados después de una semana, demostró presencia de colágena II y colágena X y escasa producción de Colágena I.

Posteriormente en 2001, Zuk (18) logró aislar y obtener células madre mesenquimatosas de tejido lipoaspirado humano con capacidad de diferenciarse hacia diferentes líneas celulares conforme el medio de inducción de diferenciación. La extracción celular la realizan mediante liposucción convencional con técnica tumescente.

Después de lavado se logra un rendimiento medio de 404 millones de células (43). En un trabajo posterior (44), caracterizaron esta población celular. La inducción condrogénica, bajo condiciones de micromasa, logra una condensación celular a las 12 horas después de la inducción, seguido por la formación de crestas y nódulos a los 2 días. Los nódulos en esta etapa son positivos para la tinción AB que tiñe PGs sulfatados. La condrogénesis es dependiente de la alta densidad, y de la presencia de factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1). Los nódulos inducidos por 14 días expresan queratán y condritín sulfato y colágena tipo II. Cuantitativamente, existe un aumento en la expresión de PGs sulfatados hasta las 2 semanas de inducción, seguido de una disminución a las 3 semanas. Esto puede representar una remodelación de la matriz condral. El medio de cultivo resulta en la expresión génica consistente con la condrogénesis, específicamente colágena tipo II isoformas IB y IIB (21). También expresan el Proteoglicano aggrecan, entre los días 7 al 10. Otras colágenas inducidas son tipo I y III, además de los PGs, decorin y biglican.

Huang y cols. En 2002 (26), con un método similar obtuvieron células madre de los cojines grasos inguinales de las ratas y logran su diferenciación condrogénica y osteogénica. Después de la expansión en cultivo por tres recambios, logran la diferenciación condrogénica utilizando TGF β -1, insulina, transferrina y dexametasona como inductores. Mediante tinción con Azul Alcian determinaron la presencia de PGs sulfatados y mediante inmunohistoquímica la presencia de colágena tipo II. No se observa condrogénesis con cultivos celulares con densidades celulares menores a las 1×10^6 /ml.

Otro abordaje de importancia en la ingeniería tisular del cartílago, es la obtención de cartílago autólogo, la expansión en cultivo y posterior reimplante (2).

Van Osch y cols. (29) lograron diseñar cartílago derivado de condrocitos obtenidos de aurículas de conejos jóvenes y adultos, así como de humanos. Después de 5 a 8 semanas los condrocitos humanos pudieron insertarse en matrices de alginato como andamio.

Estos resultados han comparado la calidad del cartílago neoformado y el cartílago en expansión. Chiang en el 2011 (11) analizó las diferencias entre condrocitos articulares y Células madre mesenquimatosas (MSCs) con inducción condrogénica; incluyendo las propiedades biológico moleculares y mecánicas, como la fuerza de adhesión, rigidez de membrana y la cuantificación de proteínas, proteómicas y RNA mensajero. Demostrando que en los condrocitos hay mayor expresión de colágena II e integrinas, comparado con las MSCs, mientras que ambas expresan colágena II, Glicosaminoglicanos. De igual forma describió que existen diferencias notorias en la forma. Por su parte la fuerza de adhesión y la rigidez de superficie fueron menores en las MSCs. Concluyendo que los condrocitos articulares y las MSCs inducidos no presentan las mismas características moleculares y físicas.

3. JUSTIFICACION

El tejido cartilaginoso es ampliamente utilizado para la reconstrucción de tejidos blandos, especialmente en el campo de cirugía plástica y reconstructiva, así como en otras disciplinas médicas como la ortopedia y cirugía de columna. Sin embargo, las zonas donadoras de este tejidos en la anatomía humana son limitadas y producen una morbilidad mayor o menor en las zonas donadoras. Hoy en día la ingeniería tisular es una técnica prometedora en las técnicas de cirugía reconstructiva, evitando la utilización de sitios donadores, sus limitaciones y sus efectos secundarios.

La diferenciación condrogénica a partir de células Madre mesenquimatosas (MSCs) ha abierto una nueva alternativa terapéutica en la reconstrucción de tejidos osteocartilaginosos sin la necesidad de utilizar cartílago hialino articular y no articular se hace indispensable. Las diversas descripciones de la literatura médica ya han determinado una composición adecuada de los componentes celulares y de la matriz extracelular de estas células diferenciadas obtenidas en cultivos. También en la literatura médica especializada existen diferentes reportes entre los cultivos cartilaginosos obtenidos a partir de médula ósea, tejido adiposo y de cartílago articular enfocados a diferenciar propiedades biomecánicas, como resistencia, elasticidad, así como estructurales como, el contenido de proteínas de matriz extracelular, tipos de colágena y la velocidad de diferenciación.

Sin embargo, en la revisión de la literatura médica efectuada no hemos encontrado estudios que describan las características histológicas y moleculares de las subpoblaciones cartilaginosas dominantes (cartílago elástico, hialino o fibrocartílago) obtenidos a partir de tejido graso sometido a diferenciación celular y crecimiento y del cartílago auricular sometido a expansión in vitro. Hecho que es fundamental para la utilización clínica de los condrocitos cultivados y facilitar la indicación en las diferentes reconstrucciones y optimizar su integración, permanencia en el largo plazo y los resultados estético-funcionales. Por esta razón, este estudio representa una nueva aportación original a la literatura médica y muy útil para el cirujano plástico y reconstructivo.

4. HIPOTESIS

Si la diferenciación condrogenica de células madre de grasa es eficiente comparándola con el cartílago auricular entonces podremos determinar sus características mediante técnicas morfológicas, histológicas y moleculares.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL:

Determinar la subpoblación cartilaginosa obtenida a partir de células madre de tejido adiposo sometidas a inducción condrogénica y del cartílago auricular expandido *in vitro* por estudios histológicos y moleculares en un modelo animal.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Caracterizar morfológicamente, histológicamente y molecularmente las células y la matriz extracelular del cartílago obtenido por inducción condrogénica de células madre de tejido adiposo *in vitro*.
2. Caracterizar morfológicamente, histológicamente y molecularmente células y la matriz extracelular del cartílago obtenido de la expansión celular y crecimiento y de condrocitos auriculares *in vitro* un modelo animal y determinar la subpoblación cartilaginosa conforme a sus características.
3. Determinar la tasa de crecimiento de las células obtenidas por inducción condrogénica por medio de cámara de Neubauer a las 4, 6 y 8 semanas.
4. Al final del estudio determinar la viabilidad de las células obtenidas tanto por inducción condrogénica como por expansión celular para ser empleadas en la reconstrucción de tejidos cartilaginosos.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Tipo de Estudio

Estudio prospectivo, comparativo, transversal aleatorizado y abierto.

De cada rata se obtendrán muestras de cultivo tanto de grasa como de oreja, ambos tejidos de la misma rata y se generarán cultivos a los que se realizarán las determinaciones de expresión de proteínas. Cada cultivo es considerado una población individual en si mismo.

6.2. Criterios de Selección de la Muestra

Criterios de Inclusión.

Se incluirán ratas Wistar de 12 semanas de edad proporcionadas por el bioterio del Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Se incluirán en el estudio todos los cultivos celulares obtenidos de todas las ratas.

Criterios de eliminación.

Cultivos que no prosperen.

De manera natural muchos tejidos no se adaptan al crecimiento in vitro por lo que no se puede garantizar que todos los cultivos sean exitosos.

6.4. Variables

Independientes.		Dependientes.	
Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Método de obtención del tejido (grasa vs cartílago)	Nominal	# de condrocitos viables	Continua numérica
Tiempo de implantación (4, 8 semanas)	Ordinal	Morfología celular	Nominal politómica
Método de inducción condrogénica (si, no)	Nominal	(Estirpe de células,)	Ordinal
		Presencia de condrocitos viables (si, no)	Nominal
		Tinción de PGs con Masson (1-10)	Nominal
		Tinción de fibras elásticas	Nominal
		Apariencia histológica de cartílago (si, no)	Nominal
		Tinción de PAS	Nominal
		Colágena tipo I (Col IA2)	Nominal
		Colágena tipo II (Col II)	Nominal
		Gliceraldehido 3 Fosfato	Nominal
		Deshidrogenasa (GAPDH)	

6.5. Tamaño de la Muestra.

El cálculo del tamaño muestras se fundamenta en función a la variable del grado de diferenciación celular. Johnstone (17) en su trabajo aumento de un 25% a 100% de diferenciación condrogénica de células madre de médula ósea agregando TGF Beta. Se pretende estimar las diferencias de proporciones entre ambos grupos celulares sometidos a diferentes métodos de cultivos in vitro comparando la diferencia en la presencia de proteínas de matriz extracelular principalmente de colágena.

$$n = \frac{z^2 (p^1 q^1 + k p^2 q^2)}{k \epsilon^2}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.5) (0.5) + (0.5) (0.5)}{(0.3)^2}$$

$$n = \frac{1.9208}{0.09}$$

n= 21.3 muestras

error alfa del 0.5

Potencia de 0.8

z= 1.96

diferencia de proteínas de matriz extracelular (0.3)

6.6. Métodos de Laboratorio

- a) Todas las muestras serán examinadas histológicamente a 20x, 40x y 100x con las tinciones para cartílago, examinando la apariencia general. Se tomarán muestras a lo largo de todo el molde para determinar la presencia de homogeneidad en los moldes
- b) Se analizarán subjetivamente por dos observadores la presencia de PGs y GAGs sulfatados mediante la Tinción de Masson, Tinción de PAS, Fibras elásticas y Fibras reticulares respectivamente, midiendo como variable nominal dicotómica si no, dependiendo si existe o no tinción positiva. Se utilizará un control de cartílago humano normal asignando si no a la ausencia de tinción.
- c) Se observan características macroscópicas, color, número, forma de las células.

- d) La matriz extracelular se evalúa en búsqueda de: Contenido de Glicosaminglicanos, distribución de las fibras de colágeno en la matriz por medio de histología y microscopía de luz polarizada.
- e) Análisis por inmunohistoquímica de colágena tipo II. Las secciones se incubarán con solución PBS por 1 hora, seguido del anticuerpo primario para la colágena tipo II por una noche. Después del lavado en PBS, se incubarán los segmentos con los anticuerpos fluorescentes. Por una hora. Por último se montarán las muestras en un medio de montaje y se realizará el análisis en un microscopio fluorescente con filtros para cada unión fluorescente.
- f) Análisis de Proteínas y PCR. Se cultivarán los tejidos de grasa y oreja, se les coloca en Quiasol (quiagen) para extraer el RNA y se congelarán a -75°C Se determinará la concentración del RNA por fotometría y se correrá en gel de agarosa/formaldehído para ver la integridad. Se sintetizarán cDNA con la reverso transcriptasa (promega) siguiendo. La cantidad de mRNA para cada una las proteínas a determinar (Colagena I, II y agregán se determinará por RT-PCR en tiempo real utilizando syber green. Para determinar la cantidad de proteínas en cada cultivo se hará un extracto crudo con un homogenizador celular y un amortiguador de lisis (Tris 10mM, triton 1% e inhibidor comercial de proteasas AMRESCO), este extracto proteico se someterá a electroforesis de archilamida para separar las proteínas y se transferirán a una membrana de nitrocelulosa, se identificaran con anticuerpos comerciales y se cuantificaran por densitometría
- g) Análisis de la tasa de proliferación. El número de células duplicado durante el tiempo de incubación o expansión se determinará por el logaritmo (en base de 2) del número de veces que incrementó durante este tiempo

6.7. Análisis Estadístico

a) Estadística Descriptiva.

Las medidas de tendencia central que se emplearán para las variables dimensionales serán el promedio, la media, en el caso de número de condrocitos viables, grado de diferenciación. La medida de dispersión será la desviación estándar.

b) Estadística inferencial

Para variables dicotómicas como la presencia o ausencia de condrocitos, colágena, proteoglicanos, proteínas de matriz extracelular, se utilizarán tablas de contingencia y análisis de Chi cuadrada.

Para el análisis de las diferencias entre el grupo de células derivadas de tejido adiposo y los condrocitos nativos se valoraron con un prueba de t de Student y “U” de Mann-Whitney en caso de distribución no normal en caso de existir una distribución anormal en la expresión de proteínas de matriz, colágena y en la expresión de proteínas por PCR entre ambos grupos.

Los valores de una $p < 0.05$ se consideraron como una diferencia estadísticamente significativa.

El análisis estadístico se realizará mediante el programa de SPSS versión 15.0 y Excel (Office Microsoft).

6.8. Descripción Operativa del Estudio

1. Obtención de tejidos

- a) Manejo de animales de laboratorio. Se utilizarán 10 ratas Wistar de 3 meses de edad con peso entre 250 a 300 g. Se manejarán y prepararán bajo los lineamientos del Departamento de Bioterio del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. Se alojarán individualmente en jaulas de policarbonato con alimentación a libre acceso (Harlan Teklad) y agua potable a libre demanda. Se eliminarán endoparásitos y ectoparásitos. La analgesia y anestesia para el evento quirúrgico se realizará mediante Hidrocloruro de Xilazina (5-10 mg/kg) + Clorhidrato de ketamina (44 mg/kg), por vía IP. Como analgesia posoperatoria se utilizará meglumina de flunixin 2.5-5 mg/kg SC. En caso de datos de infección en el posoperatorio se utilizará cefalexina 15 mg/kg SC.
- b) Extracción de tejido. Se extraerán mediante incisiones inguinales los colchones de grasa inguinal bilateralmente. Se extraerá el cartílago auricular bilateral completamente mediante incisiones retroauriculares. Para finalmente cerrar las incisiones de manera habitual.

2. Procesado de grasa inguinal (28)

- a) Cultivo celular y expansión. Se triturarán finamente los colchones y se incubarán en placas de 100 mm² (Beckton Dickinson, EUA), con medio: Dubbeco modificado por Eagle (DMEM) con suero fetal bovino, 10%, antibiótico/antimicótico 30% y 0.5 mg. de gentamicina por una hora. El tejido se enjuagará por tres ocasiones en salina-búfer fosfato por 5 minutos,

seguido de digestión con 0.075% de colagenasa con agitación por 40 min. a 37°C. A continuación se agregará un volumen de DMEM con suero 10% para neutralizar la colagenasa. Se retirarán los fragmentos grandes sin digerir manualmente y se permitirá a las células su contención en tubos cónicos de 50 cc. Se realizará centrifugación a 1300 rpm (260g) por 5 minutos y resuspensión en DMEM con suero 10%. Las células madre se colocarán en concentraciones de 10^5 células por caja de cultivo de 100 mm^2 .

- b) *Inducción condrogénica*. El cultivo a la segunda resiembra se tripsinizará, y se someterá a suspensión en medio de control en concentración de 1×10^7 céls/ml. Las células suspendidas y concentradas (10^5 céls / 10 microlitros) se dejan adherir por 2 hrs a 37°C/5% CO_2 en el centro de cada pozo, cubiertas con medio control e incubadas una noche hasta una concentración de 1×10^7 /ml. El medio se reemplaza con medio condrogénico y los cultivos se inducen por 6 días. Se añade medio de diferenciación (se mantiene hasta completar la inducción por 14 días).
- c) Medio condrogénico: DMEM, 1% suero, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ insulina, 10 ng/ml TGF- β_1 , 50 nM ascorbato-2-fosfato, 0.2 μM dexametasona 1% antibiótico/antimicótico

3. *Procesado de cartílago auricular (26)*

- a) *Cultivo celular y expansión*. Aproximadamente 1 cm^2 de cartílago se cortará finamente y se lavo con salina con búfer fosfato, suplementada con antibiótico/antimicótico. Se digiere el tejido una noche en colagenasa 0.3% en medio de cultivo a 4°C. Los condrocitos se sembrarán en platos a 0.5 a 1×10^4 células por plato. En los cultivos subsecuentes se sembrarán a 1×10^6 células / 175 cm^2 . Finalmente los condrocitos obtenidos por el subcultivo, se sembrarán en una densidad de 1×10^4 células / cm^2 dos o tres veces sobre las células previamente sembradas obteniéndose condrocitos en estado de gel.
- b) Medio de cultivo: Mezcla de F-12 y DMEM 1:1 v/v con 10% de suero, antibiótico penicilina G (50 U/ml) y estreptomina sulfato (0.1mg/ml).

4. *Confirmación de condrogénesis. (27).*

De los cultivos celulares con escaso material se obtienen especímenes para citología; mientras de aquellos con mayor volumen celular se realiza bloque celular. Para el estudio citológico, de los tubos con células se obtendrán directamente de las muestras. Las cuales se colocan sobre portaobjetos y luego teñidas con Hematoxilina y eosina (H&E). Para el bloque celular, las células del cultivo fueron fijadas con formalina neutra al

10% por al menos 8 horas y posteriormente procesada por alcoholes, Xilol y parafina. Posteriormente, son embebidas en parafina y recortadas a 3 micras para tinciones de H&E, tinción de PAS, tinción de Masson, fibras elásticas y Retículo. Las dos últimas con el objetivo de demostrar fibras elásticas y reticulares, elementos presentes en cartílago elástico y fibrocartílago, respectivamente.

5. Tipificación de Cartílago.

- a) Se pasaran las muestras a medio de fijación con alcohol etílico al 96%. Posteriormente se centrifugan a 9000 revoluciones para compactar las células. Se prepara un bloque celular, el cual se fijo en formalina neutra al 10% por seis horas. Se procesa por formol, alcoholes, xilol y parafina hasta tener estado sólido. Se obtendrán niveles de corte, los cuales serán teñidos por Hematoxilina y eosina.

Durante el desarrollo del estudio se conservaran los sujetos muestra en el bioterio hasta corroborar un adecuado crecimiento celular de la muestra obtenida, con la finalidad de que pudieran ser posibles donadores en caso de falla en el crecimiento y/o diferenciación celular de uno o ambos grupos.

Al finalizar el experimento, se sacrificará a los animales con una sobredosis de pentobarbital sódico y se tomarán las muestras. Los cadáveres serán depositados en bolsas de plástico amarillas, especiales para contención de residuos biológico infecciosos, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002

Análisis de muestras.

- a) Todas las muestras serán examinadas histológicamente a 20x, 40x y 100x con las tinciones para cartílago, examinando la apariencia general. Se tomarán muestras a lo largo de todo el molde para determinar la presencia de homogeneidad en los moldes
- b) Se analizarán subjetivamente por dos observadores la presencia de PGs y GAGs sulfatados mediante la Tinción de Masson, Tinción de PAS, Fibras elásticas y Fibras reticulares respectivamente, midiendo como variable nominal dicotómica si no, dependiendo si existe o no tinción positiva. Se utilizará un control de cartílago humano normal asignando si no a la ausencia de tinción.
- c) Se observan características macroscópicas, color, número, forma de las células.

- d) La matriz extracelular se evalúa en búsqueda de: Contenido de Glicosaminglicanos, distribución de las fibras de colágeno en la matriz por medio de histología y microscopía de luz polarizada.
- e) Análisis por inmunohistoquímica de colágena tipo II. Las secciones se incubarán con solución PBS por 1 hora, seguido del anticuerpo primario para la colágena tipo II por una noche. Después del lavado en PBS, se incubarán los segmentos con los anticuerpos fluorescentes. Por una hora. Por último se montarán las muestras en un medio de montaje y se realizará el análisis en un microscopio fluorescente con filtros para cada unión fluorescente.
- f) Análisis de Proteínas y PCR. Se cultivarán los tejidos de grasa y oreja, se les coloca en Qiasol (quiagen) para extraer el RNA y se congelarán a -75°C Se determinará la concentración del RNA por fotometría y se correrá en gel de agarosa/formaldehído para ver la integridad. Se sintetizarán cDNA con la reverso transcriptasa (promega) siguiendo. La cantidad de mRNA para cada una las proteínas a determinar (Colagena I, II y agrecán se determinará por RT-PCR en tiempo real utilizando syber green. Para determinar la cantidad de proteínas en cada cultivo se hará un extracto crudo con un homogenizador celular y un amortiguador de lisis (Tris 10mM, triton 1% e inhibidor comercial de proteasas AMRESCO), este extracto proteico se someterá a electroforesis de archilamida para separar las proteínas y se transferirán a una membrana de nitrocelulosa, se identificaran con anticuerpos comerciales y se cuantificaran por densitometría
- g) Análisis de la tasa de proliferación. El número de células duplicado durante el tiempo de incubación o expansión se determinará por el logaritmo (en base de 2) del número de veces que incrementó durante este tiempo

7. RESULTADOS

En este estudio se incluyeron un total de 18 ratas Wistar con un peso de 250 a 300 gramos, 14 hembras y 4 machos, con edad promedio de 12 semanas de edad.

Células madre de tejido adiposo con diferenciación condrogénica.

Bajo anestesia general, y técnica de asepsia y antisepsia, en todas, se obtuvo una primera muestra de tejido adiposo de la región inguinal con peso de 1.5 a 2 gramos y luego una segunda muestra de cartílago auricular de 1 cm de ancho x 1.5 cm de largo.

El tejido adiposo se preparó y tripsinizó, para posteriormente ser sumergido en un medio de inducción condrogénico para su diferenciación a ésta línea celular por un período de seis semanas. Los condrocitos obtenidos se sembraron en un medio formado por una mezcla de F-12 y DMEM 1:1 v/v con 10% de suero, antibiótico penicilina G (50 U/ml) y estreptomycin sulfato (0.1mg/ml). Las lecturas realizadas del desarrollo de estas células mostraron los siguientes resultados:

Se analizó a las cuatro semanas, en una citología líquida con tinción de H y E, a una amplificación de 100x, donde se observaron nichos celulares con diferentes momentos de diferenciación desde adipocitos hacia condrocitos. Todos estos hallazgos son característicos de las células cartilaginosas. (Fig. 1) De igual forma, Se analizaron cortes histológicos de cultivos celulares de adipositos diferenciados a las 8 semanas embebidos en parafina teñidas con H&E, PAS, Masson, Fibras elásticas y Retículo. Con las tinción de H&E se observan grupos y láminas de células poligonales grandes con abundante citoplasma eosinófilo, ocasionalmente basófilo, con núcleos irregulares, ligeramente hipercrómicos, rechazados a la periferia, sin nucléolo (Figura 2). Estos grupos celulares se encuentran inmersos sobre una matriz de aspecto mixoide acelular ligeramente basófilo (Figura 3). Estos datos son compatibles con diferenciación condroide, la cual es más evidente con la tinción de PAS, en la cual se observa con mejor detalle la separación entre el componente celular y la matriz (Figura 3). Con la tinción de Masson distinguen con más detalles las características de las células, en la cual se observan el contorno de las membranas citoplasmáticas, así como la variabilidad en el tamaño nuclear; también se observa que algunas células se agrupan con otras para dar forma a estructuras que remedan condrocitos dentro de lagunas (Figura 4). La matriz se aprecia de color azul claro, lo cual refleja su naturaleza rica en colágeno y mucopolisacaridos (Figura 4). Con las tinciones de

Fibras elásticas y retículo no se aprecian depósitos de fibras elásticas ni de fibras reticulares (Figuras 5 y 6). El resultado de los datos de histoquímica sugiere diferenciación hacia cartílago hialino y excluye la diferenciación hacia cartílago elástico (Fibras elásticas negativas) y fibrocartílago (Retículo negativo).

Cartílago auricular nativo en expansión

Los fragmentos de cartílago auricular obtenidos de las ratas, se trituraron finamente, se lavaron y fueron sumergidos en colagenasa 0.3% en medio de cultivo a 4°C por una noche. Luego se filtraron en nylon de poro de 100 µm, aislando los condrocitos. Estos se sembrarán en platos en diferentes concentraciones celulares: 0.5 a 1 x 10⁴ células, 0.5 a 1x10⁶ células por plato.

Posteriormente se realizaron subcultivos en densidades de 1 X 10⁴ células / cm² dos o tres veces sobre las células previamente sembradas hasta obtenerse condrocitos en estado de gel. El medio de cultivo empleado fue una mezcla de F-12 y DMEM 1:1 v/v con 10% de suero, antibiótico penicilina G (50 U/ml) y estreptomycin sulfato (0.1mg/ml).

En los cortes histológicos a las 8 semanas de los condrocitos en expansión teñidos con H&E, Masson y Fibras elásticas. Con la tinción de H&E se observan grupos y láminas de células poligonales de tamaño regular con abundante citoplasma eosinófilo, con núcleos regulares, ligeramente hiperocrómicos, y en región central, sin nucléolo (Figura 7). Estos grupos celulares se encuentran inmersos sobre una matriz de aspecto condromixoides acelular basófila. Con la tinción de Masson se delimita el contorno de las membranas citoplasmáticas, así como la irregularidad en el tamaño nuclear. Se forman pequeños acúmulos celulares dentro de lagunas. La matriz se aprecia de color azul, lo cual refleja su naturaleza rica en colágeno y mucopolisacaridos (Figura 8). En la tinción de Fibras elástica se aprecian depósitos moderados en la matriz extracelular de fibras elásticas teñidas de un color pardo (Figura 9). El resultado de los datos de histoquímica sugiere la presencia de células con características de cartílago elástico. Sin ofrecer las características típicas de este tejido.

Después de 8 semanas de cultivo y en base a las tinciones antes descritas, se compararon nuestros hallazgos con las descripciones histológicas del cartílago hialino reportadas en la literatura. Al compararlas, no se observaron diferencias estructurales significativas en las células cultivadas desde grasa, estas tienen una forma poligonales, con núcleos hiperocrómicos y citoplasma homogéneo. Al comparar las células obtenidas desde cartílago estas presentaron una forma más redondeada y contenían una mayor cantidad de citoplasma. También se identificó hiperocrromasia nuclear en estas células diferenciadas. (Figura 2 y 7)

Al analizar la matriz extracelular de ambos grupos, los cultivos de cartílago desde la grasa muestran una matriz extracelular muy similar a la del cartílago hialino, por el contenido de fibras de colágena demostrado por la tinción azul-violácea que sugiere una mayor proporción de colágena tipo I. A diferencia de los condrocitos auriculares en donde existe menor intensidad de la tinción por el menor contenido de colágena tipo I. Lo que se traduce en una menor producción de colágena tipo I o la posibilidad de diferenciación celular leve. (Figura 3 y 8)

La tinción de fibras elásticas fue negativa en los adipocitos diferenciados, lo que es característico del cartílago hialino normal. Por su parte la tinción fue moderadamente positiva en los condrocitos en expansión, lo que se traduce en una matriz con escasa a moderada presencia de fibras elásticas y/o retraso en la formación de estas comparada con el cartílago elástico normal. (figura 4)

Finalmente, la negatividad en la captación en la tinción para fibras reticulares por los adipocitos diferenciados comparada con cartilago hialino articular normal, donde se suele observar una captación mínima, podría sugerir una disminución en resistencia mecánica de este nuevo tejido en comparación con el cartílago hialino normal. (Figura 6) Lo que replicaría los reportes previos donde analizar las características mecánicas de condrocitos derivados de médula ósea (26)

Por otra parte la negatividad en la captación de esta misma tinción en los condrocitos en expansión es propia del cartílago elástico.

El recuento celular se realizó por medio de hemocitómetro (cámara de Neubauer), en ambos cultivos después de transcurrido un período de 7 semanas de incubación in vitro tras la digestión con colagenasa, se obtuvo un conteo de $4.5 \pm 3 \times 10^6$ en promedio en el cultivo de adipocitos diferenciados y $2.7 \pm 2 \times 10^6$ en los condrocitos en expansión. Los resultados fueron consistente indicando que la tasa de proliferación de los adipocitos diferenciados fue significativamente mayor (1.66 a 1.71 veces) que los condrocitos en expansión in vitro en la presencia de los factores de inducción condrogénica.

El análisis bioquímico por RT-PCR después de 8 semanas demostró que los condrocitos diferenciados de tejido adiposo expresan mRNA de colágena tipo II. De igual forma se observa expresión de colágena II en los condrocitos en expansión con la misma intensidad que los adipocitos diferenciados en todas las muestras. Los niveles de mRNA en ambos grupos no fueron significativamente diferentes (Fig 10). Estos hallazgos son consistentes con las observaciones histológicas en las tinciones para fibras de colágena (Fig. 4 y 8)

En la sección de resultados se describen en forma ordenada los resultados obtenidos en el estudio

Hacer una cuidadosa selección de la forma de representación gráfica más descriptiva para los datos obtenidos

Figuras: para mejor impresión de las figuras, éstas deben ser en blanco y negro. En el caso de gráficas de barras seleccione diferentes tramas de relleno en blanco y negro. Evitar usar colores debido a que no reproducen adecuadamente en la impresión.

Las figuras y tablas deben ser ubicadas en un sitio de acuerdo con el texto donde son citadas. EVITAR la ubicación de las figuras al final de la sección o del documento.

8. DISCUSION

En la cirugía reconstructiva, donde las técnicas actuales con tejidos autólogos, heterólogos, y materiales aloplásticos no le permiten al cirujano hacer una reconstrucción funcional y estética (1), se ha abierto una alternativa a las técnicas con ingeniería tisular siendo una vía prometedora para generar tejidos adecuados para la reparación y regeneración de estos. (28-31) Desde el cultivo y expansión de células de cartílago nativo para producir grandes segmentos de neocartílago que sean capaces de aumentar o reponer el tejido deficiente (32) con estrategias que pretenden incluir el uso de células madre, andamios biodegradables o bioincorporados, factores de crecimiento o citocinas y terapia génica(34) que puedan ser aplicados de forma exitosa en la cirugía reconstructiva, ortopédica y estética. Las células madre han sido una aportación importante desde su descripción inicial debido a su capacidad de proliferación, automantenimiento y la capacidad de diferenciarse a una progenie funcional (adipocitos, condrocitos, miocitos, neuronas y osteocitos (29) que tenga la propiedad de regenerar el tejido afectado o perdido.

El tejido cartilaginoso es ampliamente utilizado en la cirugía reconstructiva y estética en diferentes disciplinas como la reconstrucción de cabeza y cuello, de tráquea, deformidades torácicas, manejo de superficies articulares de la estructura ósea de la mano y la Articulación temporomandibular (ATM). Sin embargo, la limitación de tejido cartilaginoso en la anatomía humana limita el tratamiento autólogo de este tejido (2) para reparar o aumentar el tejido perdido y recuperar las características mecánicas, estructurales, funcionales y estéticas (30) propias de las diferentes zonas anatómicas del cuerpo humano; pudiendo clasificarse en las siguientes subpoblaciones: **Cartílago hialino**, presente en costillas, laringe, tráquea, bronquios, superficie articular de los huesos. A su vez, se clasifica en: *Cartílago no articular* Fosas nasales, cartílago tiroideo, anillos traqueales, bronquios, inserción esternal de las costillas. *Cartílago articular*. En todas las articulaciones móviles. **Fibrocartílago** que se encuentra en: sínfisis del pubis, anillos de discos intervertebrales, en algunos ligamentos, meniscos y articulación temporomandibular (ATM) y **Cartílago elástico**. Presente en el oído externo, trompas de Eustaquio y epiglotis.

La intención de este estudio fue identificar la subpoblación de cartílago que se deriva de la inducción condrogénica de células madre de tejido adiposo y observar los cambios estructurales y morfológicos que sufren de los condrocitos auriculares en cultivo después de un periodo de tiempo definido para determinar su probable aplicación clínica. Investigamos la tasa de proliferación celular, grado de

diferenciación, y desdiferenciación de ambos grupos celulares y de forma alterno se compararon con cartílago hialino y elástico normal.

Con los resultados obtenidos después de un período de 8 semanas de cultivo pudimos valorar la capacidad de diferenciación de las células madre derivadas a partir del tejido adiposo a condrocitos, empleando la técnica de inducción y estimulación descrita previamente por Huang y Zuk (26) obteniendo al estudio histológico pequeñas células poligonales con formación de lagunas inmersas en una matriz. Estas lagunas fueron relativamente más pequeñas que el tejido hialino normal. (Fig 2 y 3).

La viabilidad celular en ambos grupos no mostro diferencias significativas después del período de estudio corroborado por la presencia de proteoglicanos en la matriz extracelular al aplicar la tinción de PAS y Masson, así como por la síntesis de colágena tipo II identificada por RT-PCR y por observación histológica; la cuál fue ligeramente más intensa en los adipocitos diferenciados que en los condrocitos en expansión sin ser significativamente diferente (Fig 10). Finalmente después del análisis histológico y bioquímico, demostramos que la diferenciación de las células de tejido adiposo bajo el estímulo de la inducción condrogénica son capaces de desarrollar un cartílago de buena calidad comparado con el cultivo de condrocitos nativos en medio de cultivo, conforme a la presencia de proteoglicanos, tasa de proliferación y síntesis de fibras de colágena.

Las técnicas empleadas en este trabajo nos ofrecen información suficiente para demostrar que las ATSC se diferencian hacia un patrón tisular compatible con cartílago hialino, corroborado en las características de su matriz extracelular, y la negatividad de fibras elásticas y reticulares. Señalando que las diferencias mínimas en relación al cartílago hialino, revelan que el cartílago obtenido sea de menor dureza que el cartílago articular conservando el resto de las características de esta subpoblación de cartílago.

Por lo anterior, la importancia de conocer la subpoblación de cartílago que se desea reconstruir es necesaria para generar el mejor modelo de tejido cartilaginoso con las características fisiológicas, morfológicas y estética de la zona afectada. Por lo que este cartílago diferenciado posee propiedades similares al cartílago hialino que permita ser empleado en la reconstrucción de estructuras craneofaciales, como la reconstrucción nasal y de la placa tarsal, donde encontramos un cartílago hialino con moderada resistencia y maleabilidad, lo que permite un terreno favorable para la aplicación de estas células diferenciadas a partir del tejido adiposo, y permita suplir las técnicas quirúrgicas actuales y ofrecer un mejor resultado estético funcional.

Este es el primer estudio que trata de identificar con precisión las características morfológicas, estructurales, y composición de las células y de la matriz del cartílago diferenciado de células madre del tejido adiposo. Su relevancia se hace notar al revisar la literatura médica donde autores como Kolja (33), que describe el empleo de condrocitos derivados de costilla para reconstrucción de tejido articular de rodilla en un modelo animal, encontrando francas diferencias en las características estructurales, biológicas y bioquímicas así como en la tasa de proliferación y composición de la matriz extracelular comparada con el cartílago nativo. Así como las descripciones de reconstrucción auricular donde el marco cartilaginoso se obtiene de cartílago costal (34), logrando un buen resultado morfológico y estructural sin embargo carece de las propiedades mecánicas del cartílago elástico propias del tejido auricular nativo y con ello, persistiendo los estigmas de la patología del paciente.

Por este motivo se ha intentado cultivar y emplear los condrocitos de la región auricular para fabricar un molde de oreja con tejido autólogo y las propiedades elásticas de este. Sin embargo se ha demostrado que los condrocitos auriculares autólogos pueden perder sus características físicas al prepararse y cultivarse in vitro, como lo describió Lee (35) en su trabajo, en donde después de realizar cultivos in vitro de condrocitos auriculares en diferentes medios, observó la pérdida de su fenotipo condrogénico y la capacidad de síntesis de algunos componentes de matriz extracelular. Este hallazgo se comprobó de forma similar en nuestro estudio, al observar una leve disminución de fibras elásticas en las tinciones para estas estructuras en los condrocitos nativos en expansión in vitro. Lo que limita a los condrocitos auriculares como fuente única para realizar reconstrucciones auriculares cuando existe la intención de preservar las características propias de este tipo de cartílago.

Estos hallazgos y descripciones sugieren el empleo de técnicas y alternativas con moléculas reguladoras o factores físicos para lograr un fenotipo condrogénico más selectivo capaz de generar células de cierta subpoblación con características similares a la zona afectada. Como lo han demostrado trabajos en la literatura médica donde se han hecho cultivo de células madre del pericondrio, tejido auricular, y nasoseptal como posibles fuentes de tejido cartilaginoso para la reconstrucción auricular con las características físicas, mecánicas y estéticas del cartílago auricular nativo (35). Kobayashi (36) identificó la presencia de células progenitoras de cartílago en el pericondrio auricular con las características de células madre, identificados por la presencia de CD90- y CD 44+. Lo que se traduce en la posibilidad de diferenciación pluripotencial y ser empleadas como una fuente celular útil en la reconstrucción auricular promoviendo la flexibilidad elástica, y limitando su grado de apoptosis.

Por otra parte se han estudiado los factores externos que influyen en la diferenciación cartilaginosa y principalmente hacia fibrocartílago. Un trabajo realizado por Thomopoulos donde aplicó presión hidrostática positiva multiaxial a células mesenquimatosas en cultivo in vitro. Esta manipulación generó cambios en la morfología de los condrocitos y en la composición de la Matriz extracelular caracterizada por la producción de fibras reticulares y mayor expresión de colágena 1, lo que se traduce en características compatibles con Fibrocartílago. Lo cuál de traduciría en una alternativa terapéutica para casos de anquilosis de la Articulación Temporomandibular, donde hasta la fecha el tratamiento estándar consiste en colocar injertos autólogos de cartílago costal.(38)

Otras líneas de investigación en la ingeniería tisular cartilaginosa que surgen de este trabajo es la identificación y desarrollo de nuevas biomoléculas como factores inductores de crecimiento y diferenciación, que en estudios y pruebas futuras sirvan como adyuvantes en la diferenciación cartilaginosa o permitan a las células en cultivo conservar sus propiedad a lo largo del tiempo, como el caso del factor de crecimiento tisular del tejido conectivo (CTGF), el cual en los reportes previos ha mostrado ser un agente adecuado para la promover la diferenciación y crecimiento de los condrocitos auriculares previniendo su mineralización y apoptosis y promoviendo la formación de fibras elásticas. (39) Lo que permitiría el empleo de este tejido para una mejor definición, funcionalidad y resultado estético.

9. CONCLUSIONES

El trabajo demostró la capacidad de obtener condrocitos a partir de adipocitos después de la inducción condrogénica en un modelo animal. Así mismo se logró obtener crecimiento de condrocitos en cultivo a partir de cartílago auricular. Por las características morfológicas de la célula y la disposición estructural en la matriz extracelular, los condrocitos diferenciados dan una morfología compatible con cartílago hialino, mientras que los condrocitos obtenidos por expansión de cartílago auricular presentan una morfología más compatible con cartílago elástico.

En esta base, la importancia de conocer la subpoblación de cartílago cultivado es fundamental para las futuras aplicaciones clínicas de esta bioingeniería tisular. De esta manera podremos generar el mejor modelo de tejido cartilaginoso que posea las características fisiológicas, morfológicas y estéticas de la zona a reconstruir.

El cartílago hialino obtenido en estos cultivos tiene las características ideales para en un futuro ser empleado en la reconstrucción de estructuras craneofaciales, como la reconstrucción nasal y de la placa tarsal. Característicamente todas estas estructuras poseen un cartílago hialino con moderada resistencia y maleabilidad, por lo que son elementos anatómicos donde favorablemente para su reconstrucción pueden utilizarse el tejido cartilaginoso obtenido desde grasa. Evitando los sitios donadores, su morbilidad y sumando las características naturales de los cartílagos nativos a reconstruir.

10. PERSPECTIVAS

Con estos resultados, será necesario el estudio de la de factores externos que influyen en la diferenciación cartilaginosa y principalmente hacia fibrocartílago.

Thomopoulos aplicó presión hidrostática positiva a células mesenquimatosas in vitro. Lo que generó cambios en los condrocitos y en la Matriz extracelular. Adicionando fibras reticulares y una mayor expresión de colágena I, lo que es compatible con Fibrocartílago.

Este fibrocartílago cultivado será un precioso elemento a interponer para tratamiento de anquilosis de la Articulación Temporomandibular y evitar su alta tasa de recidiva. Así también será de gran utilidad en la reconstrucción de discos intervertebrales.

Otras líneas de investigación en la ingeniería tisular cartilaginosa que surgen de este trabajo es la identificación y desarrollo de nuevas biomoléculas como factores inductores de crecimiento y diferenciación, que en estudios y pruebas futuras sirvan como adyuvantes en la diferenciación cartilaginosa o permitan a las células en cultivo conservar sus propiedad a lo largo del tiempo, como el caso del factor de crecimiento tisular del tejido conectivo (CTGF), el cual en los reportes previos ha mostrado ser un agente adecuado para la promover la diferenciación y crecimiento de los condrocitos auriculares previniendo su mineralización y apoptosis y promoviendo la formación de fibras elásticas. Lo que permitiría el empleo de este tejido para una mejor definición, funcionalidad y resultado estético.

11. BIBLIOGRAFIA

1. De Ugarte DA, Ashjian PH, Elbarbary A, Hedrick MH. Future of fat as raw material for tissue regeneration. *Ann Plast Surg* 2003;50:215–219.
2. Randolph MA, Yaremchuk MJ. Repair, grafting and engineering of cartilage, *Plastic Surgery*. 2da edición. Elsevier Inc. Philadelphia, EUA. 2006.
3. Hendeson J, Welter J, Mansour J. Cartilage Tissue Engineering for Laryngotracheal Reconstruction: Comparison of Chondrocytes from Three Anatomic Locations in the Rabbit. *Tissue Eng* 2006, 13:4,843-860.
4. Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound healing: an overview. *Otolaryngol Clin North Am* 1995;28:847-64
5. Brent B. The versatile cartilage autograft: current trends in clinical transplantation. *Clin Plast Surg* 1979;6:163.
6. Cervelli V, Bottini J, Gentile P, et al. Reconstruction of the Nasal Dorsum With Autologous Rib Cartilage *Ann Plast Surg* 2006;56: 256–262.
7. Brenner KA, McConnell MP, Evans GR, Calvert JW. Survival of diced cartilage grafts: An experimental study. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006;117:105-115
8. Hagerty RF, Braid HL, Bonner WM et al. Viable and nonviable cartilage homografts. *Surg Gynecol Obstet* 1967;125:485
9. Bujia J, Pitzke P, Wilmes E, et al. A critical analysis of human immunodeficiency virus transmission using cartilage allografts. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993;250:129-133.
10. Ruiz Romero G, Moreno M, López M, Vega M. *Medicina Regenerativa y Terapia celular. Informe de Vigilancia Tecnológica. GENOMA ESPAÑA/FUAM, 2008*
11. Chiang H, Chang H H, Lin YH. Differences between chondrocytes and bone marrow-derived chondrogenic cells. *Tissue Eng.* 2011,17: 23,2919-2931.
12. Brockes JP, Kumar A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science.* 2005 Dec 23;310(5756):1919-23.
13. Afizah H, Yang Z, Hui JH, Ouyang HW. A Comparison Between the

Chondrogenic Potential of Human Bone Marrow Stem Cells (BMSCs) and Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Taken from the Same Donors. *Tissue Eng* 2007;13:659 – 666.

14. Benya, PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; 30: 215-224.

15. Quatela VC, Sherris DA, Rosier RN. The human auricular chondrocyte responses to growth factors. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg* 1993;119: 32-37.

16. Arevalo-Silva CA, Cao Y, Weng Y, et al. The effect of fibroblast growth factor and transforming growth factor- beta on porcine chondrocytes and tissue engineered autologous elastic cartilage. *Tissue Eng* 2001;7: 81-88.

17. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998; 238: 265-272.

18. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue; implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-228.

19. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 1998; 47: 487-504.

20. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998;4:415-428.

21. Fromigué O, Marie PJ, Lomri A. Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 1998; 68:411-426.

22. Worster AA, Brower-Toland BD, Fortier LA, Bent SJ, Williams J, Nixon AJ. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three dimensional matrix. *J Orthop Res* 2001;19: 738-749.

23. Benya PD, Padilla SR. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 1978;15: 1313-1321.

24. Im GI, Jung NH, Tae SK. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem

Cells Isolated from Patients in Late Adulthood: The Optimal Conditions of Growth Factors. *Tissue Eng* 2006;12:527-536.

25. Erickson IE, Huang AH, Chung C, Li RT, Burdick JA, Mauck RL. Differential maturation and structure- function relationships in mesenchymal stem cell- and chondrocyte-seeded hydrogels. *Tissue Eng Part A* 2009;15:1041-1052.

26. Huang JI, Beanes SR, Zhu M et al. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast Reconstr Surg* 2002;19:1033-1041

27. Yanaga H, Yanaga K, Koga M et al. Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg*; 2006;117:2019-2030

28. Isogai N, Asamura S, Higashi T, Ikada Y. Tissue engineering of an auricular cartilage model utilizing cultured chondrocyte-poly(L-lactide-epsilon-caprolactone) scaffolds. *Tissue Eng*. 2004 May-Jun;10(5-6):673-87.

29. Lalan, S. Pomerantseva, I., and Vacanti, J. P. Tissue engineering and its potential impact on surgery. *World J. Surg.* 2001;25: 1458,

30. Passaretti, D., Silverman, R. P., Huang, W., et al. Cultured chondrocytes produce injectable tissue-engineered cartilage in hydrogel polymer. *Tissue Eng* 2001; 7: 805,

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

32. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.

33. Kolja Gelse, Matthias Brem, Patricia Klinger, Andreas Hess, Bernd Swoboda, Friedrich Hennig, Alexander Olk. 2009. Paracrine effect of transplanted rib chondrocyte spheroids supports formation of secondary cartilage repair tissue. *Journal of Orthopaedic Research* 27:9, 1216-1225.

34. Nagata Satoru. A new method of total reconstruction of the Auricle for Microtia. *Plast Reconstr Surg* 1993;92:187-201

35. Lee HJ, Choi BH, Min BH, et al. Low-intensity ultrasound stimulation enhances chondrogenic differentiation in alginate culture of mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 2006 Sep;30:707e15.

36. Kobaya S, Takebe T. Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44+ CD90+ stem cell in the ear perichondrium. *PJNAS*, 2011, 35:1448-1452

37. Khadka j. Autogenous grafts for condylar reconstruction in treatment of TMJ ankylosis: current concepts and considerations for the future. *Int J. Oral Maxillofac Surg* 2011. In Press

38. Sterodimas A, de Faria j, Pitanguy I. Tissue engineering and auricular reconstruction: a review. *J Plast, Reconstr & Aesth Surg* 2009; 62, 447-452

39 Fujisawa T, Hattori T, Ono M, et al. CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) stimulates proliferation and differentiation of auricular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2008 Feb 18.