



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

CULTIVO DE CONDROCITOS Y CÉLULAS EPITELIALES SOBRE SOPORTES DE ÁCIDO POLILÁCTICO PARA REGENERACIÓN DE VÍAS AÉREAS

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: IRENE MONLEÓN GUINOT

TUTORA EXTERNA: DRA. LARA MILIÁN MEDINA

COTUTOR EXTERNO: DR. MANUEL MATA ROIG

TUTOR ACADÉMICO: DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ RIBELLES

Curso académico: 2018-2019

VALENCIA, julio 2019

CULTIVO DE CONDROCITOS Y CÉLULAS EPITELIALES SOBRE SOPORTES DE ÁCIDO POLILÁCTICO PARA REGENERACIÓN DE VÍAS AÉREAS

Autora: Irene Monleón Guinot

Valencia, julio 2019

Tutora externa: Dra. Lara Milián Medina

Cotutor externo: Dr. Manuel Mata Roig

Tutor académico: Dr. José Luis Gómez Ribelles

Reserva de todos los derechos

RESUMEN

Objetivos: Las vías aéreas cumplen un papel muy importante en el organismo ya que son las responsables tanto de llevar el aire a los pulmones como de acondicionarlo. El cartílago tiene una función esencial de soporte mientras que la mucosa respiratoria es la encargada del aclaramiento mucociliar. Enfermedades como la estenosis afectan a estas estructuras impidiendo la correcta realización de sus funciones y resultando en graves consecuencias para quienes las sufren, además de que los tratamientos actuales no son efectivos. Las técnicas de ingeniería tisular son prometedoras para la reconstrucción de este tipo de defectos, por ello en este trabajo se plantea el uso del ácido poliláctico como soporte en estrategias de regeneración del cartílago y la mucosa de las vías aéreas.

Metodología: En primer lugar, se caracterizó la estructura, citotoxicidad y propiedades mecánicas de los soportes de ácido poliláctico. Posteriormente, se sembraron condrocitos primarios sobre *scaffolds* de ácido poliláctico impresos en 3D con y sin hidrogeles, y se evaluó mediante marcaje fluorescente la morfología y la expresión de colágeno de tipo I, de tipo II y agrecano. También se sembraron células epiteliales primarias y las líneas celulares A549 y H460 sobre membranas electrohiladas de ácido poli-L-láctico con y sin colágeno, y se analizó mediante fluorescencia la proliferación y morfología, así como la expresión de genes relacionados con la mucosa respiratoria (CDH1, CK20 y MUC5AC) mediante *Real Time PCR*.

Resultados: Los soportes de ácido poliláctico resultaron ser no citotóxicos además de que mostraron propiedades mecánicas similares a los de la tráquea, con un Módulo de Young de entre $2,6 \pm 0,1$ y $3,6 \pm 0,2$ MPa según el espesor. Por otra parte, los condrocitos sembrados en los *scaffolds* de PLA expresaron proteínas propias del cartílago hialino como colágeno II y agrecano principalmente cuando se combinó el *scaffold* con el hidrogel de alginato y agarosa. Además, las células epiteliales mostraron una proliferación adecuada tapizando las membranas con y sin colágeno, y en el caso de las A549 y las células epiteliales primarias, mostraron expresión de CDH1, lo que significa que sí que tienen características de epitelio.

Conclusiones: Los resultados obtenidos permiten concluir que el uso de ácido poliláctico como soporte para condrocitos y células epiteliales presenta una potencial capacidad para la regeneración de vías aéreas.

PALABRAS CLAVE: Cartílago, mucosa respiratoria, ingeniería tisular de vías aéreas.

ABSTRACT

Objectives: The airways play a very important role in the organism since they are responsible for both carrying the air to the lungs and conditioning it. Cartilage has an essential support function while the respiratory mucosa is responsible for mucociliary clearance. Diseases such as stenosis affect these structures, preventing the proper performance of their functions and resulting in serious consequences for those who suffer them, in addition to the fact that current treatments are not effective. Tissue engineering techniques are promising for the reconstruction of this type of defects, so in this project the use of polylactic acid as a support in regeneration strategies of the cartilage and the mucosa of the airways is considered.

Methodology: Firstly, the structure, cytotoxicity and mechanical properties of the polylactic acid supports were characterized. Subsequently, primary chondrocytes were seeded on 3D printed polylactic acid scaffolds with and without hydrogels, and the morphology and expression of type I, type II and aggrecan collagen was evaluated by fluorescent labeling. Primary epithelial cells and the A549 and H460 cell lines were also seeded onto electrohilated membranes of poly-L-lactic acid with and without collagen, and proliferation and morphology were analyzed by fluorescence, as well as the expression of genes related to the respiratory mucosa (CDH1, CK20 and MUC5AC) by Real Time PCR.

Results: The polylactic acid scaffolds were found to be non-cytotoxic, in addition to showing mechanical properties similar to those of the trachea, with a Young's modulus between 2.6 ± 0.1 and 3.6 ± 0.2 MPa depending on the thickness. On the other hand, the chondrocytes grown in the PLA scaffolds expressed hyaline cartilage proteins such as collagen II and aggrecan mainly when the scaffold was combined with the alginate and agarose hydrogel. In addition, the epithelial cells showed an adequate proliferation on membranes with and without collagen, and in the case of the A549 and the primary epithelial cells, they showed expression of CDH1, which means that they do have epithelial characteristics.

Conclusions: The results obtained allow us to conclude that the use of polylactic acid as a scaffold for chondrocytes and epithelial cells presents a potential capacity for the regeneration of airways.

KEY WORDS: Cartilage, respiratory mucosa, airways tissue engineering.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Vías aéreas	1
1.1.1. Tráquea.....	1
1.1.2. Cartílago hialino	2
1.1.3. Mucosa respiratoria.....	3
1.2. Afecciones de las vías aéreas	3
1.2.1. Estenosis de las vías aéreas	3
1.3. Ingeniería de tejidos	4
1.3.1. <i>Scaffolds</i>	4
1.3.2. Técnicas de fabricación	5
1.3.2.1. <i>Impresión 3D</i>	5
1.3.2.2. <i>Electrospinning</i>	5
1.3.3. Polímeros.....	5
1.3.3.1. <i>Ácido poliláctico (PLA)</i>	5
1.3.4. Hidrogeles.....	7
1.3.4.1. <i>Alginato</i>	7
1.3.4.2. <i>Agarosa</i>	7
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIALES	9
3.1. Tipos celulares	9
3.2. Medios de cultivo y de acondicionamiento	9
3.3. Reactivos e instrumentos	10
3.4. Material fungible	12
4. MÉTODOS	13
4.1. Fabricación y esterilización de <i>scaffolds</i> de PLA	13
4.2. Métodos de caracterización de los <i>scaffolds</i> de PLA	13
4.2.1. Microscopía electrónica de barrido	13
4.2.2. Ensayo de tracción.....	14
4.2.3. Ensayo de citotoxicidad	14
4.3. Aislamiento y cultivo de condrocitos	14
4.3.1. Aislamiento de condrocitos del cartílago articular	14
4.3.2. Tripsinización, contaje y congelación celular	15

4.3.3. Descongelación y cultivo de condrocitos	15
4.4. Siembra de condrocitos en <i>scaffolds</i> de PLA	15
4.5. Fabricación, esterilización y acondicionamiento de las membranas electrohiladas de PLLA.....	17
4.6. Microscopía electrónica de barrido de las membranas electrohiladas de PLLA.....	18
4.7. Aislamiento y cultivo de células epiteliales	18
4.7.1. Aislamiento y cultivo de células epiteliales primarias de mucosa nasal ...	18
4.7.2. Cultivo de A549 y H460	18
4.8. Siembra de A549, H460 y células epiteliales primarias en membranas electrohiladas de PLLA.....	18
4.9. Inmunofluorescencia y marcaje con fluorescencia	19
4.10. Biología molecular	20
4.10.1. Extracción y cuantificación de RNA	20
4.10.2. Reacción de retrotranscripción.....	21
4.10.3. <i>Real Time</i> PCR	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
5.1. Resultados de la caracterización de los <i>scaffolds</i> de PLA.....	23
5.1.1. Estructura de los <i>scaffolds</i> de PLA	23
5.1.2. Propiedades mecánicas de los <i>scaffolds</i> de PLA.....	23
5.1.3. Citotoxicidad de los <i>scaffolds</i> de PLA	26
5.2. Resultados del cultivo de condrocitos sobre los <i>scaffolds</i> de PLA.....	27
5.2.1. Confluencia y fenotipo de los condrocitos sobre los <i>scaffolds</i> de PLA.....	27
5.3. Resultados del aislamiento y cultivo de células epiteliales primarias	29
5.4. Estructura de las membranas electrohiladas de PLLA.....	30
5.5. Resultados del cultivo de las células epiteliales sobre las membranas electrohiladas de PLLA.....	30
5.5.1. Confluencia y morfología de las células epiteliales sobre las membranas electrohiladas de PLLA	30
5.5.2. Análisis relativo de la expresión génica de las células epiteliales.....	33
6. CONCLUSIONES.....	36
7. BIBLIOGRAFÍA.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la laringe y del árbol traqueobronquial (Burdett & Mitchell, 2011)	1
Figura 2. Estructura química del ácido poliláctico	6
Figura 3. Configuraciones estereoquímicas de moléculas de ácido láctico (Nofar et al., 2019).....	6
Figura 4. Estructura del alginato donde se muestra la estructura lineal del polisacárido compuesto por residuos de ácido 1,4'- β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) en diferentes secuencias (De Vos et al., 2014).	7
Figura 5. Estructura de la agarosa (De Vos et al., 2014)	7
Figura 6. Esquema de los condrocitos sembrados en <i>scaffolds</i> y su distribución en la placa de 24 pocillos según las condiciones de cultivo.....	16
Figura 7. Esquema de la distribución de los cultivos de células epiteliales en las cámaras de 8 pocillos, con las diferentes condiciones: sin membrana, sobre membrana sin colágeno y sobre membrana con colágeno	19
Figura 8. A) Fotografía de los <i>scaffolds</i> de cara y de perfil sobre papel milimetrado. B) Imagen obtenida en el SEM de un <i>scaffold</i> de PLA donde se aprecia la dimensión de los poros. Barra de medida: 1 mm	23
Figura 9. Fotografía de una de las probetas de espesor 2,1 mm fracturada después de finalizar el ensayo de tracción y aún sujeta por las mordazas.	23
Figura 10. Gráfica que muestra la relación tensión (eje X) - deformación (eje Y) de las 3 probetas de la muestra 1	24
Figura 11. Gráfica que muestra la relación tensión (eje X) - deformación (eje Y) de las 3 probetas de la muestra 2.....	25
Figura 12. Gráfica que muestra la relación tensión (eje X) - deformación (eje Y) de las 3 probetas de la muestra 3.....	25
Figura 13. Resultados del ensayo de citotoxicidad donde se presenta el % de viabilidad celular al haber incubado las células con los distintos medios condicionados durante 24, 48 y 96 horas	27
Figura 14. A) Condrocito sin fibras de estrés. B) Condrocito con fibras de estrés. En ambas imágenes se ve el núcleo marcado con DAPI (azul) y las fibras de f-actina del citoplasma marcadas con faloidina (rojo). Barra de medida: 25 μ m	28
Figura 15. Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia de condrocitos de conejo en cultivo 3D sobre <i>scaffolds</i> en 3 condiciones distintas: sembrados sobre <i>scaffolds</i> sin hidrogel (A, A' y A''), sembrados sobre <i>scaffolds</i> con un hidrogel de alginato 3% (B, B' y B'') y sembrados sobre <i>scaffolds</i> con un hidrogel de alginato 3% - agarosa 1% (C, C' y C''). En las distintas inmunofluorescencias se han marcado el colágeno I (verde; A, B y C), el colágeno II (verde; A', B' y C') y el agregano (verde; A'', B'' y C''). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul) y los filamentos del citoesqueleto de f-actina están marcados con faloidina (rojo). Barras de escala: 25 μ m.	29
Figura 16. Imagen a 10x de las células epiteliales primarias sembradas durante 1 semana en un pocillo de la placa de 12 pocillos	29

Figura 17. Imágenes obtenidas en el SEM de una membrana de PLLA a 600x (A) y a 2800x (B). Barras de medida: 10 μm (A) y 1 μm (B)	30
Figura 18. Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia de la línea celular A549 en 3 condiciones distintas a dos aumentos diferentes: crecidas en las cámaras Millicell sin membranas a 10x (A) y a 63x (A'), crecidas sobre una membrana de PLLA sin colágeno a 10x (B) y a 63x (B') y crecidas sobre una membrana de PLLA con colágeno a 10x (C) y a 63x (C'). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul) y los filamentos del citoesqueleto de f-actina están marcados con faloidina (rojo). Barras de escala: 250 μm (A, B y C) y 25 μm (A', B' y C').....	31
Figura 19. Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia de la línea celular H460 en 3 condiciones distintas a dos aumentos diferentes: crecidas en las cámaras Millicell sin membranas a 10x (A) y a 63x (A'), crecidas sobre una membrana de PLLA sin colágeno a 10x (B) y a 63x (B') y crecidas sobre una membrana de PLLA con colágeno a 10x (C) y a 63x (C'). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul) y los filamentos del citoesqueleto de f-actina están marcados con faloidina (rojo). Barras de escala: 250 μm (A, B y C) y 25 μm (A', B' y C').....	32
Figura 20. Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia de las células epiteliales primarias a 45x en 2 condiciones distintas con dos marcajes diferentes: crecidas en membrana sin colágeno y con los núcleos marcados con DAPI (azul) (A), crecidas en las mismas condiciones y con el citoplasma marcado con faloidina (rojo) (A'), crecidas en membrana con colágeno y con los núcleos marcados con DAPI (azul) (B) y crecidas en las mismas condiciones y con el citoplasma marcado con faloidina (rojo) (B'). Barra de escala (indicada en la imagen B'): 50 μm	33
Figura 21. Expresión relativa de los genes CDH1, CK20 y MUC5AC en las células A549 crecidas en las cámaras de tipo Millicell (Control), crecidas sobre las membranas electrohiladas de PLLA sin colágeno (Sin colágeno) y crecidas sobre estas membranas con colágeno (Con colágeno).	34
Figura 22. Expresión relativa de los genes CDH1, CK20 y MUC5AC en las células epiteliales primarias crecidas en las cámaras de tipo Millicell (Control), crecidas sobre las membranas electrohiladas de PLLA sin colágeno (Sin colágeno) y crecidas sobre estas membranas con colágeno (Con colágeno)	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de fabricación de los <i>scaffolds</i> con el software CURA 2.....	13
Tabla 2. Valores medios de las propiedades mecánicas de la muestra 1 obtenidos a partir de la representación Tensión - Deformación mostrada en la Figura 10.....	24
Tabla 3. Valores medios de las propiedades mecánicas de la muestra 2 obtenidos a partir de la representación Tensión - Deformación mostrada en la Figura 11	25
Tabla 4. Valores medios de las propiedades mecánicas de la muestra 3 obtenidos a partir de la representación Tensión - Deformación mostrada en la Figura 12	26
Tabla 5. Porcentaje de campos de cada condición (<i>Scaffold</i> : <i>Scaffold</i> sin hidrogel; Alg: <i>Scaffold</i> con hidrogel de alginato 3%; Alg-ag: <i>Scaffold</i> con hidrogel de alginato 3%-agarosa 1%) en los que hay expresión o no de colágeno I, colágeno II y agrecano.....	28

ABREVIATURAS Y SIGLAS

2D: Dos dimensiones; Bidimensional
3D: Tres dimensiones; Tridimensional
Alg: Alginato
Alg-ag: Alginato-agarosa
ACAN: Agrecano
ATCC: American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
BEBM: Medio basal de crecimiento de células epiteliales bronquiales
BEGM: Medio de crecimiento de células epiteliales bronquiales
bRT: Blanco de la reacción de retrotranscripción
BSA: Albúmina de suero bovino
CBIT: Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular
CDM: Medio de diferenciación de condrocitos
cDNA: DNA complementario
Col I: Colágeno de tipo I
Col II: Colágeno de tipo II
CT: Ciclo umbral
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DCM: Diclorometano
DCP: Discinesia ciliar primaria
DFM: N,N-Dimetilformamida
DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico
dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato
dUTP: 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EEUU: Estados Unidos
FAM: Amidita de fluoresceína
FDA: Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
FBS: Suero fetal bovino
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GHR: Genetics Home Reference
HEPES: Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazineetanosulfónico
LAS AF: Leica Application Suite Advanced Fluorescence
MEM: Medio esencial mínimo
mRNA: RNA mensajero
MTT: Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio)
NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica)
NEAA: Aminoácidos no esenciales
NIBIB: National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering (Instituto Nacional de Imagen Biomédica y Bioingeniería)
PBS: Tampón fosfato salino
PLA: Ácido poliláctico
PLDA: Ácido poli-D-láctico

PLLA: Ácido poli-L-láctico
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
RCF: Fuerza centrífuga relativa
RNA: Ribonucleica cid (ácido ribonucleico)
RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute
RT: Retrotranscripción
SEM: Microscopio/microscopía electrónico/a de barrido
STL: Lenguaje de triángulo estándar
Tf: Temperatura de fusión
TRITC: Tetrametilrodamina
UNG: Amperasa Uracil N-Glicosilasa
UV: Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Vías aéreas

Las vías aéreas se corresponden con los órganos del tracto respiratorio que permiten el flujo de aire durante la ventilación (Ball & Padalia, 2019). Su función principal es la conducción acondicionamiento del aire inspirado a los pulmones. También se encargan de extraer el aire en la espiración, además de participar en la protección de los pulmones, la fonación y la deglución. Las vías aéreas se pueden subdividir en las vías aéreas superiores e inferiores (San Martín & Caussade, 2012). Las vías aéreas superiores incluyen la cavidad nasal con el vestíbulo nasal, los senos paranasales, la faringe y la laringe. Mientras que a las vías aéreas inferiores, o árbol traqueobronquial, pertenecen la tráquea, los bronquios mayores con sus respectivas subdivisiones bronquiales hasta finalmente el bronquiolo terminal, y por último los ductos y sacos alveolares (Figura 1) (San Martín & Caussade, 2012).

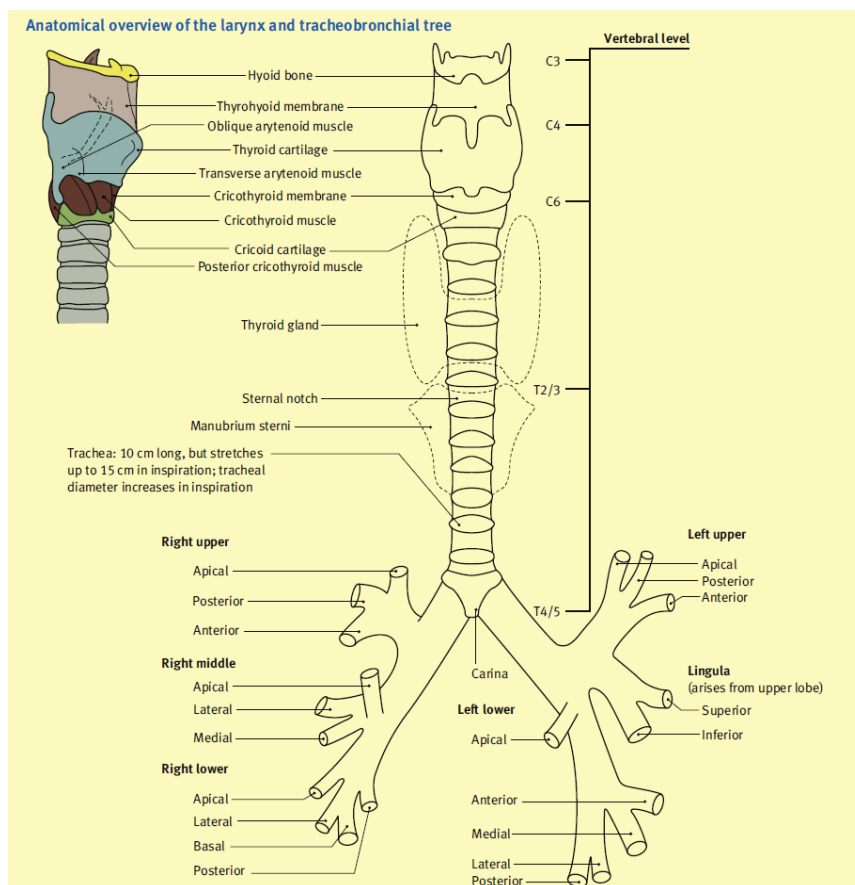


Figura 1. Anatomía de la laringe y del árbol traqueobronquial (Burdett & Mitchell, 2011).

1.1.1. Tráquea

La tráquea forma parte de las vías aéreas inferiores y consiste en una estructura tubular longitudinal semiflexible esencial para el paso del oxígeno y otros gases que viajan a los alvéolos para su difusión (Ball & Padalia, 2019) (Mieczkowski & Seavey, 2019). Mide unos 12 cm de largo y alrededor de 1,5 cm de ancho, y transcurre por delante del esófago extendiéndose desde la porción inferior de la laringe hasta que se bifurca para formar los dos bronquios que van a los pulmones (Brand-Saberri & Schäfer, 2014). La tráquea se

encuentra formada de interior a exterior por 4 capas: mucosa, submucosa, capa fibromusculocartilaginosa y adventicia (Welsch, 2014).

La mucosa de la tráquea tiene un grosor de unos 50 μm y está compuesta por epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado (epitelio respiratorio), tejido conjuntivo subepitelial (lámina propia) y glándulas traqueales seromucosas. En el epitelio respiratorio hay células ciliadas, que se encuentran a lo largo de toda la vía aérea y dirigen el batido de los cilios hacia la laringe transportando partículas y detritos lejos de los pulmones (Brand-Saberi & Schäfer, 2014); células caliciformes, responsables de producir la mucosa traqueal que protege a los pulmones de infección (Fishman *et al.*, 2014) (Mieczkowski & Seavey, 2019); y células basales, que son las precursoras de las células ciliadas y las caliciformes, pero también cumplen una función en el afianzamiento del epitelio en la membrana basal gruesa (Welsch, 2014). El moco de las glándulas traqueales y bronquiales y de las células caliciformes, junto con los cinocilios del epitelio respiratorio, forman el aparato mucociliar. Las partículas de suciedad inspiradas se adhieren al moco y junto con él son transportadas por los cinocilios hacia la faringe, donde pueden deglutirse o expectorarse (Welsch, 2014). La lámina propia está compuesta por tejido conjuntivo laxo, con fibras colágenas muy juntas que se separa de la submucosa por una membrana elástica (Ross & Pawlina, 2008).

La submucosa está formada por tejido conjuntivo laxo y similar al de la lámina propia. Es rica en elastina, músculo liso y glándulas submucosas que se extienden hasta la superficie epitelial para la secreción al exterior (Haykal *et al.*, 2014).

La capa fibromusculocartilaginosa está formada por entre 16 y 20 anillos de cartílago hialino con forma de C que fortalecen la pared e impiden el colapso del lumen durante la respiración y mantienen el flujo respiratorio máximo con la dinámica adecuada (Fu *et al.*, 2017). Los extremos de los anillos están unidos por músculo liso (músculo traqueal) y tejido conjuntivo (pared membranosa) que contiene una gran cantidad de fibras elásticas que se prolongan en la cubierta conjuntiva de la superficie externa del cartílago (Welsch, 2014).

La capa más externa es la adventicia, ubicada por fuera de los anillos traqueales y del músculo traqueal. Fija la tráquea a las estructuras contiguas, y contiene los nervios y vasos linfáticos mayores que irrigan, inervan y drenan la pared traqueal (Ross & Pawlina, 2008).

1.1.2. Cartílago hialino

El cartílago hialino se encuentra en todas las vías aéreas. Su matriz tiene un aspecto vítreo con lagunas que contienen condrocitos, responsables de producir la matriz del cartílago hialino, y está compuesta principalmente de moléculas de colágeno y proteoglicanos. El colágeno es la proteína principal de la matriz, y el más abundante es el de tipo II, que es uno de los componentes de las fibrillas matriciales. Los proteoglicanos están formados por condroitín sulfato y queratán sulfato unidos a una proteína central de hialuronano. El monómero de proteoglicano más abundante en el cartílago hialino es el agregano. De hecho, cada molécula de hialuronano se asocia con más de 300 agreganos para formar grandes aglomeraciones de proteoglicanos, que se unen a las fibrillas colágenas de la matriz formando un entramado. Debido a que el agregano tiene carga negativa y gran afinidad por las moléculas de agua, la matriz del cartílago hialino está muy hidratada teniendo el agua intercelular un porcentaje de aproximadamente el 70% del peso neto del cartílago. Esta

hidratación imparte elasticidad además de otras características biomecánicas propias del cartílago hialino como resistencia a la compresión, amortiguación y sostén estructural en el aparato respiratorio (Ross & Pawlina, 2008).

1.1.3. Mucosa respiratoria

La integridad de las superficies epiteliales depende en gran medida de la adhesión lateral de las células entre sí y de su capacidad de resistir la separación. Aunque hay una fusión de membranas celulares contiguas, su resistencia ante el estrés mecánico es limitada y el refuerzo de esta región depende de un sitio de unión fuerte por debajo de esa zona de fusión. Ese dispositivo de adhesión lateral se presenta en la forma de una banda continua alrededor de la célula, que está compuesta por la molécula de adhesión E-cadherina que es una proteína transmembrana (Ross & Pawlina, 2008). Por otra parte, los principales constituyentes macromoleculares de la capa mucosa son las mucinas. Estas glicoproteínas ligeramente glicosiladas son ricas en cisteínas y establecen enlaces disulfuro entre otros monómeros de mucina. El moco normal se compone de ~1% de mucinas, ~1% de sales, ~1% de otras proteínas y ~97% de agua. Las células caliciformes expresan típicamente MUC5AC, mientras que las células de la mucosa de las glándulas submucosas expresan principalmente MUC5B (Wanner *et al.*, 1996) (Bustamante-Marín & Ostrowski, 2016).

1.2. Afecciones de las vías aéreas

Las vías aéreas están expuestas al medio externo y por ello son propensas a sufrir afecciones, con graves consecuencias si no se tratan a tiempo y de la manera adecuada.

1.2.1. Estenosis de las vías aéreas

La estenosis de las vías aéreas es una enfermedad rara pero severa que consiste en un estrechamiento del diámetro del lumen (Jakobsen *et al.*, 2017). Esta afección puede ser congénita o adquirirse como consecuencia de una intubación endotraqueal prolongada, un trauma, quemaduras, inflamación, una enfermedad neoplásica o una enfermedad autoinmune (Nair *et al.*, 2015) (Wain, 2009) (Cheng *et al.*, 2017). Este estrechamiento produce dificultad para respirar e incluso puede llevar a la completa obstrucción de la vía, impidiendo totalmente el paso de aire y haciendo necesaria una traqueostomía (Mieczkowski & Seavey, 2019). La aerodinámica alterada también puede afectar la mecánica mucociliar y la depuración de las vías respiratorias. Por estos factores, la estenosis conduce a una considerable morbilidad y mortalidad (McDaniel *et al.*, 2018) (Timman *et al.*, 2018).

Desde finales del siglo XIX la estenosis traqueal se puede solucionar con la resección quirúrgica del segmento afectado y una anastomosis termino-terminal, que consiste en la extracción del segmento estrechado y la unión de los dos extremos que quedan de la vía, restaurando un conducto con un ancho normal (Ho & Koltai, 2008) (Macchiarini, 2008). Sin embargo, esta operación solo es posible cuando la parte a eliminar de la vía respiratoria no supera los 6 cm, que es aproximadamente la mitad de la longitud total de la tráquea en un adulto, o cuando no supera un tercio de la longitud total de la tráquea en un niño (Jungebluth *et al.*, 2011). Una resección de un segmento estenótico de mayor tamaño está contraindicada ya que supondría una mayor tensión anastomótica (Ho & Koltai, 2008). Más recientemente, la traqueoplastia deslizada ha mejorado significativamente los resultados

para pacientes previamente inoperables (Wang *et al.*, 2015). Esta operación quirúrgica consiste en la división del segmento estenótico transversalmente en la mitad de su longitud. Se realiza entonces una incisión a lo largo de la parte posterior del segmento estenótico superior, y también se realiza una incisión a lo largo de la parte anterior del segmento estenótico inferior. Los dos extremos se deslizan para unirlos, y da como resultado un área de sección transversal cuadruplicada (Grillo, 1994). Sin embargo, este procedimiento repara la estenosis sacrificando parte de la longitud de la vía aérea. Por tanto, las estrategias quirúrgicas actuales tienen importantes limitaciones con respecto a la localización y longitud de la zona afectada, además de conllevar problemas post-quirúrgicos (Gao *et al.*, 2017).

Otra solución a la estenosis son los trasplantes, que sin embargo requieren de medicación inmunosupresora con niveles adecuados para evitar el rechazo del tejido y, por tanto, la pérdida del injerto en el caso en el que hubiese un defecto en la cantidad de inmunosupresión, pero evitando también el riesgo que esta medicación implica de contracción de infecciones si se dan niveles de inmunosupresión en exceso. Además, la inmunosupresión no es recomendable en pacientes oncológicos, y sin ella el trasplante no va a tener éxito (Engels *et al.*, 2011) (Lee *et al.*, 2017).

Una opción novedosa para superar estos obstáculos es el uso de sustitutos para reemplazar los segmentos estenóticos, mediante la ingeniería de tejidos (Gao *et al.*, 2017).

1.3. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo que combina la medicina y la ingeniería para reparar, reemplazar o regenerar tejidos u órganos enfermos o dañados para restaurar la función del tejido nativo manteniendo la morfología e histología (Mallick *et al.*, 2016). Esta rama de la bioingeniería emplea *scaffolds*, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales (NIBIB, 2013). Su principio básico es la creación de un *scaffold* biocompatible en el que se pueda estimular el crecimiento de las células *in vivo* sembrando antes de la implantación o mediante un reclutamiento posterior (Maughan *et al.*, 2016). Por tanto, la ingeniería de tejidos ofrece la posibilidad de una solución a largo plazo para las enfermedades graves de las vías respiratorias mediante la creación de reemplazos de tejidos y órganos funcionales e inmunocompatibles (Maughan *et al.*, 2016). Además, hay cada vez más evidencias de que la ingeniería tisular y el uso de sustitutos son técnicas útiles y efectivas para regenerar las vías aéreas (Walles *et al.*, 2004) (Gao, 2017).

1.3.1. *Scaffolds*

La elección y diseño del *scaffold* es una parte primordial en la ingeniería de tejidos ya que además de proporcionar un soporte para las células donde puedan adherirse y diferenciarse, proporciona señales estructurales y funcionales para el proceso de regeneración y deberían permitir una integración sostenida cuando se trasplantan (Maughan *et al.*, 2016). Un *scaffold* apropiado para el trasplante de vía aérea debería tener las siguientes características según Fishman *et al.* (2014) y Maughan *et al.* (2016):

1. Ser biocompatible para que tenga incapacidad para provocar una respuesta adversa del huésped, además de no carcinogénico, no tóxico y no inmunogénico.
2. Tener capacidad de ser integrado por los tejidos circundantes y promover la proliferación y la diferenciación celular; además de ser capaz de potenciar la neovascularización, permitiendo el transporte de nutrientes.

3. Imitar la arquitectura macroscópica y microscópica de la región de la vía aérea que se reemplaza.
4. Ser mecánicamente estable y resistente para evitar el colapso de la vía aérea manteniendo las propiedades mecánicas de la vía como soporte estructural para proteger las vías respiratorias y permitir la epitelización.
5. Estar fácilmente disponible.

1.3.2. Técnicas de fabricación

Para fabricar *scaffolds* adecuados para ingeniería tisular, se pueden usar distintos métodos como la impresión tridimensional (3D) o el *electrospinning* entre otros.

1.3.2.1. Impresión 3D

En la actualidad, el uso de la impresión 3D está en continuo crecimiento en el campo de la ingeniería tisular. Esta técnica se está investigando por su potencial uso para reconstrucción de vías aéreas complejas, ya que tiene la ventaja de una fabricación rápida y fácil que puede reproducir e imitar la forma nativa de la vía y sus capacidades intrínsecas. Sin embargo, su aplicabilidad a la reconstrucción traqueal es preliminar en el mejor de los casos, con estudios limitados informados hasta el momento (Lee *et al.*, 2015).

1.3.2.2. Electrospinning

La técnica de *electrospinning* es la más usada para la fabricación de nanofibras. En este proceso un intenso campo eléctrico aplicado a la gota de una disolución de un polímero en un disolvente polar, que se forma en la punta de la una aguja capilar de pequeño diámetro que actúa como uno de los electrodos, conduce a la deformación de la gota formando un cono y finalmente a la expulsión de un chorro cargado desde la punta del cono que acelera hacia el contraelectrodo. El disolvente se evapora en el trayecto entre la aguja y un colector, formando una nanofibra que se deposita sobre este último. El *electrospinning* genera membranas porosas tridimensionales conectadas que pueden imitar la estructura de la matriz extracelular y, por lo tanto, se convierten en un excelente candidato para el uso en ingeniería de tejidos (Agarwal *et al.*, 2008).

1.3.3. Polímeros

Los polímeros sintéticos poseen una gran flexibilidad de procesamiento, biocompatibilidad y biodegradabilidad y son uno de los biomateriales para la fabricación de *scaffolds* más utilizados. Los biomateriales tienen un papel primordial durante la regeneración tisular, ya que no sirven únicamente como matrices para la adhesión celular, sino que también mejoran las interacciones entre los biomateriales y las células sembradas, y además participan en la proliferación y diferenciación celular y en la formación de nuevo tejido (Guo & Ma, 2018).

1.3.3.1. Ácido poliláctico (PLA)

El ácido poliláctico (PLA) (Figura 2) es un poliéster termoplástico alifático que deriva de recursos de biomasa renovable como el almidón de maíz o la caña de azúcar entre otros.

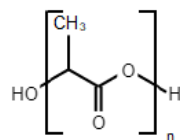


Figura 2. Estructura química del ácido poliláctico.

Es uno de los polímeros comerciales de base biológica, biodegradables y biocompatibles más desarrollados, y el más utilizado en aplicaciones clínicas actualmente. Se degrada a lo largo del tiempo de forma natural con una velocidad dependiente del pH, de la temperatura en el tejido y de la composición del polímero (Da Silva *et al.* 2018) (Nofar *et al.*, 2019). El principal mecanismo para la degradación de PLA es la hidrólisis de la cadena principal del enlace éster, descomponiéndose en monómeros de ácido láctico (Da Silva *et al.*, 2018) (Mahapatro & Singh, 2011). Además, el ácido láctico es un subproducto natural de la respiración anaeróbica, y se incorpora a distintas rutas metabólicas del cuerpo como son el Ciclo de Cori o el de Krebs (Mahapatro & Singh, 2011) (Da Silva *et al.*, 2018). El uso de PLA es por lo tanto seguro y desprovisto de cualquier toxicidad importante (Mahapatro & Singh, 2011). Por ello es ampliamente utilizado en ingeniería de tejidos como un andamio biomédico para implantes, dispositivos implantables temporales y a largo plazo, diagnósticos y sistemas de administración de fármacos (Da Silva *et al.* 2018). El ácido poliláctico es fácil de sintetizar y puede adaptarse a diferentes necesidades terapéuticas, por lo que, al diseñar nuevos sistemas con aplicaciones biomédicas, considerar el PLA como un *scaffold* puede resultar una decisión acertada (Da Silva *et al.* 2018). Además, el PLA exhibe propiedades mecánicas y físicas atractivas como alto módulo, alta resistencia, buena claridad y propiedades de barrera (Nofar *et al.* 2019).

Las moléculas de ácido láctico pueden tener dos configuraciones estereoquímicas distintas: ácido L-láctico o ácido D-láctico (Figura 3) (Nofar *et al.*, 2019).

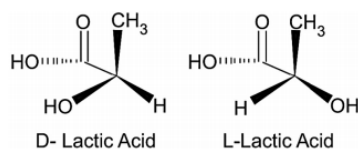


Figura 3. Configuraciones estereoquímicas de moléculas de ácido láctico (Nofar *et al.*, 2019).

El ácido poli-L-láctico (PLLA) es un material polimérico sintético de L-lactida, un derivado de la isoforma L del ácido láctico, y ha sido aprobado por la FDA para uso clínico en humanos (Izal *et al.*, 2012). Tiene una mayor temperatura de fusión (T_f) debido al aumento de la simetría molecular lo que mejora la formación de cristales con estructuras más compactas. La T_f máxima de PLLA está en el rango de 175 a 180 °C (Nofar, 2019). La quiralidad también afecta la tasa de degradación por lo que el PLLA se degradará más lento en comparación con el ácido poli-D-láctico (PLDA) (Da Silva, 2018). El PLLA es un buen candidato para el implante clínico, ya que no produce ninguna respuesta inflamatoria y se degrada más lentamente que los andamios de hidrogel autólogos, lo que proporcionaría una permanencia más prolongada de células en el paciente (Izal *et al.*, 2012).

Sin embargo, en ocasiones las propiedades físicas de los *scaffolds* hacen que las células se propaguen solo en la superficie, impidiendo que adopten una apropiada morfología y distribución ya que esa conformación es diferente a la que tienen de manera natural (Izal *et al.*, 2012). Para evitar esta situación, se han diseñado estrategias en las que se combinan hidrogeles con *scaffolds* para facilitar el crecimiento de las células en 3 dimensiones.

1.3.4. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes de polímeros hidrofílicos que pueden retener grandes cantidades de agua y son habitualmente usados en ingeniería tisular (Ahmed, 2015).

1.3.4.1. Alginato

Los alginatos son una familia de polisacáridos lineales no ramificados de origen natural que contienen cantidades variables de ácido 1,4'- β -D-manurónico y residuos de ácido α -L-gulurónico (Figura 4) (Gombotz & Wee, 1998).

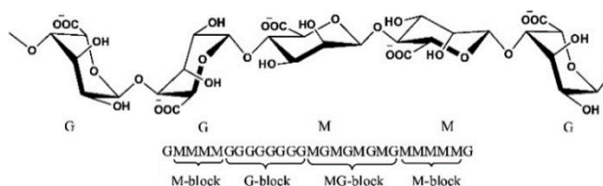


Figura 4. Estructura del alginato donde se muestra la estructura lineal del polisacárido compuesto por residuos de ácido 1,4'- β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) (De Vos et al., 2014).

Es un polímero muy habitual en la industria biotecnológica. Una de sus principales aplicaciones es la encapsulación de proteínas y células ya que ocurre a temperatura ambiente y libre de solventes orgánicos, también presenta una alta porosidad del gel que permite altas tasas de difusión de macromoléculas y además se puede controlar esta porosidad con simples procesos de recubrimiento, y la disolución y biodegradación del gel ocurre en condiciones fisiológicas normales (Gombotz & Wee, 1998). Forma hidrogeles en presencia de cationes divalentes, como Ca^{2+} , que participan en el entrecruzamiento iónico y ayudan a la reticulación de las cadenas adyacentes del hidrogel debido a su estructura y a su distribución de cargas, permitiendo su gelificación (Erickson *et al.*, 2018). Además, el alginato purificado por un procedimiento de extracción de múltiples pasos a una pureza muy alta no induce ninguna reacción significativa al cuerpo extraño cuando se ha implantado en animales (Orive et al., 2002).

1.3.4.2. Agarosa

La agarosa es un polisacárido biocompatible extraído de algas rojas marinas que contiene repeticiones de agarobiosa (disacárido de D-galactosa y 3,6-anhidro-l-galactopiranosas) (Figura 5) y se puede preparar como un gel termorreversible. El proceso de gelificación con agarosa se produce en tres pasos: inducción, gelificación y pseudoequilibrio, en los cuales el enlace de hidrógeno y la extracción electrostática dan como resultado una estructura helicoidal de la molécula de agarosa. Como resultado del enlace de hidrógeno, se pueden formar hidrogeles de agarosa sin la necesidad de agentes de reticulación tóxicos, lo que lo convierte en un polímero biocompatible (Zarrintaj *et al.*, 2018).

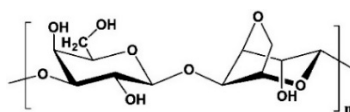


Figura 5. Estructura de la agarosa (De Vos et al., 2014).

2. OBJETIVOS

La estenosis de las vías aéreas es una enfermedad grave que afecta al lumen de las mismas impidiendo el paso del aire. Actualmente no existen tratamientos efectivos. En este trabajo se plantea como objetivo general el uso del ácido poliláctico como soporte en estrategias de regeneración del cartílago y la mucosa de las vías aéreas. Los objetivos concretos de este proyecto son:

1. Fabricación y caracterización de la estructura, citotoxicidad y propiedades mecánicas de *scaffolds* de PLA obtenidos por impresión 3D para regeneración de cartílago y de membranas electrohiladas de PLLA obtenidas por *electrospinning* para regeneración de mucosa respiratoria.
2. Aislamiento, cultivo y caracterización de condrocitos primarios de cartílago articular sobre *scaffolds* de PLA, obtenidos mediante impresión 3D, asociados o no a hidrogeles de alginato o alginato/agarosa. La caracterización de los mismos se realiza mediante el estudio de la expresión de colágeno tipo I, tipo II y agregano, así como por la determinación de fibras de f-actina mediante microscopía de fluorescencia.
3. Aislamiento y cultivo de células epiteliales obtenidas a partir de biopsias nasales.
4. Estudio de la proliferación y la morfología de células epiteliales primarias obtenidas de biopsias nasales y las líneas celulares epiteliales A549 y H460 sembradas sobre membranas electrohiladas de PLLA con y sin colágeno.
5. Cuantificación de la expresión relativa de genes con un importante papel en el epitelio respiratorio (CDH1, MUC5AC y CK20) en células epiteliales primarias, A549 y H460 sembradas sobre membranas electrohiladas de PLLA con y sin colágeno.

3. MATERIALES

3.1. Tipos celulares

En los ensayos realizados se emplearon los tipos celulares que se nombran a continuación:

Condrocitos primarios extraídos del cartílago articular de la rodilla de conejos.

Línea celular A549 proporcionada por la *American Type Culture Collection* (ATCC, Barcelona, España). Las células A549 son células epiteliales basales del alveolo humano aisladas por primera vez en 1972 por D.J. Giard *et al.*, a partir de un tumor adenocarcinómico extirpado de un varón caucásico de 58 años (ATCC, a).

Línea celular H460 proporcionada por la *American Type Culture Collection* (ATCC, Barcelona, España). Las células H460 son células epiteliales tumorogénicas que fueron aisladas en 1982 por A.F. Gazdar *et al.* a partir de fluido pleural de un paciente con cáncer de pulmón (ATCC, b).

Células epiteliales primarias humanas de la mucosa nasal extraídas a partir de una biopsia nasal.

3.2. Medios de cultivo y de acondicionamiento

El medio básico que se empleó para preparar el medio de proliferación de condrocitos se compone de medio Eagle modificado por Dulbecco 1X (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales en medio MEM 100X (MEM NEAA), 1% de penicilina-estreptomina y 1% de piruvato sódico 100mM 100X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), 1% de anfotericina B 100X y 1% de L-glutamina 100X 200 mM (EuroClone, Milán, Italia).

El medio de proliferación de condrocitos se compone de medio básico suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y 1% de ácido ascórbico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

El medio de diferenciación de condrocitos se compone de medio basal de diferenciación de condrocitos CDM™ suplementado con CDM™ SingleQuot™ Kit (Lonza, Basilea, Suiza) y 1 µl/ml de ácido ascórbico 70 mM (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

El medio de proliferación empleado para las líneas celulares A549 y H460 se compone de medio RPMI 1640 1X con L-glutamina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) suplementado con 10% de FBS inactivado, 1% de penicilina-estreptomina, 1% de tampón HEPES 1M (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y 1% de anfotericina B 100X (EuroClone, Milán, Italia).

El medio de proliferación empleado para las células epiteliales primarias es el medio de crecimiento celular para epitelio bronquial BEGM™, que se compone de medio basal para

epitelio bronquial BEBM™ suplementado con BEGM™ SingleQuot™ Kit (Lonza, Basilea, Suiza).

El medio de lavado empleado en la extracción de condrocitos se compone de DMEM 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) suplementado con 100 U de penicilina-100 µg de estreptomina (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) y 0,4% de fungizona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

El medio de acondicionamiento para las membranas electrohiladas de PLLA se compone de medio DMEM 1X suplementado con 10% de FBS inactivado y 1% de penicilina-estreptomina, todo ello de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU).

3.3. Reactivos e instrumentos

Todas las manipulaciones con cultivos celulares fueron realizadas en una sala de cultivos usando una campana de flujo laminar Mars Safety Class 2 (ScanLaf, Lyngø, Dinamarca) y una campana de flujo laminar Bioban 48 (Herascientific Life Science, Madrid, España). Los cultivos primarios se conservaron en un incubador de CO₂ (Forma Scientific Inc., Marietta, OH, EEUU) y los cultivos de líneas celulares se conservaron en un incubador de CO₂ CelCulture® (Esco, Horsham, PA, EEUU). Ambos mantienen una temperatura de 37 °C y una atmósfera humidificada del 5% de CO₂. Los medios de cultivo se atemperaron a 37 °C y los criotubos de células se descongelaron a 37 °C en un baño termostático modelo YCW-03S (Gemmy Industrial Corporation, Taipei, Taiwan).

Para la obtención de condrocitos de conejo se empleó anestesia (500 mg / iv de tiopental sódico; Tiobarbital, B. Braun Medical, Barcelona, España), las enzimas hialuronidasa, pronasa y colagenasa-IA (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), un filtro de nylon con poros de 70 µm de diámetro (BD Biosciences, San José, CA, EEUU) y un baño termostático con agitación (Labolan, Navarra, España). Y para la obtención de células epiteliales se empleó una cureta desechable (Zone Medical, Queensland, Australia).

En la tripsinización se empleó tampón fosfato salino (PBS) (EuroClone, Milán, Italia) y tripsina-EDTA (0,05%) 1X con rojo fenol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Para el conteo celular se empleó la tinción azul tripán 0,4% y el contador celular automático EVE™, ambos de NanoEnTek (Seúl, Corea del Sur). Para la congelación celular se empleó FBS inactivado (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y dimetilsulfóxido (DMSO) (EuroClone, Milán, Italia) y para fijar las células se empleó PBS (EuroClone, Milán, Italia) y formaldehído 4% en solución acuosa y tamponado (VWR International, Lutterworth, Reino Unido).

Durante los ensayos también se utilizaron una centrífuga 5.810 R refrigerada (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), una microcentrífuga Sorvall™ Legend™ Micro 17R refrigerada (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y un microscopio óptico invertido Leica DM IL LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

En las inmunofluorescencias se empleó PBS (EuroClone, Milán, Italia), el detergente surfactante no iónico Triton X-100 0,1% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), albúmina de suero bovino (BSA) 1% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), diluyente de anticuerpos EnVision FLEX (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU), los anticuerpos primarios:

anticuerpo monoclonal anti-colágeno tipo I producido en ratón (C2456) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), anticuerpo monoclonal anti-colágeno tipo II producido en ratón (CP18-100UG) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y anticuerpo monoclonal anti-agrecano producido en ratón (sc-166951) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EEUU); el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (molécula completa) fragmento F(ab')₂ conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) producido en oveja (F2883) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), faloidina-rodamina conjugada con tetrametilrodamina (TRITC) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) disuelta en metanol p.a (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a una concentración final de 6,6 μ M, DAPI 3 mM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y medio de montaje de histología Fluoroshield™ con DAPI (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se empleó el microscopio de fluorescencia Leica DM4000 B y el paquete de software para realizar las fotos Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), así como aceite de inmersión Zeiss Immersol™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Para contar la cantidad de núcleos celulares se empleó el editor de gráficos Adobe Photoshop CS5 (Adobe Inc., San José, CA, EEUU).

En la extracción de RNA se empleó TRIzol® y glucógeno 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), isopropanol y etanol absoluto (Panreac Química SLU, Barcelona, España), cloroformo p.a. y agua de cultivos (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), termobloque ThermoMixer C (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), microcentrífuga refrigerada Microfuge® 22R (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) y campana de gases OR-ST 1.200 (Burdinola, Vizcaya, España). Para cuantificar se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

Las demás reacciones de biología molecular se realizaron en una cabina de flujo laminar vertical GEMINI (Angelantoni Life Science, Massa Martana, Italia). Para la reacción de transcripción reversa se emplearon los siguientes reactivos de retrotranscripción (RT) TaqMan™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU): desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) 10mM (2,5 mM cada dNTP), transcriptasa reversa MultiScribe™ 50 U/ μ l, hexámeros de secuencia aleatoria 50 μ M, inhibidor de RNAsas (20U/ μ l), MgCl₂ 25 mM y 10X tampón RT. También se utilizó un termociclador LifePro (Hangzhou Bioer Co. Ltd., Hangzhou, China).

Para la *Real Time* PCR se empleó la Master Mix TaqMan™ Gene Expression 2X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y las sondas para las células epiteliales TaqMan™ Gene Expression (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU): CDH1 (Hs01023894_m1), MUC5AC (Hs01365601_m1) y CK20 (Hs00966063_m1) ligadas a FAM y como control endógeno se usó GAPDH (Hs99999905_m1) ligado a VIC™. Se utilizó el software Quantstudio™ Design & Analysis para preparar los experimentos, el sistema QuantStudio 5 Real-Time PCR para realizar la *Real Time* PCR y el software ExpressionSuite para analizar los resultados, todos ellos de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU).

En la fabricación de los *scaffolds* de PLA se utilizó la impresora BQ Hephestos 2 y una bobina de PLA con un filamento de 1,75 mm de diámetro (BQ, Madrid, España), la aplicación Tinkercad™ (Autodesk, San Rafael, CA, EEUU) y el software CURA 2 (Ultimaker B.V., Utrecht, Países Bajos). Y para sanitizar los *scaffolds* de PLA se empleó etanol absoluto (Panreac Química SLU, Barcelona, España) filtrado a través de filtros de 0,22 μ m de poro Filtropur S 0.2 (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), PBS (EuroClone, Milán, Italia) y un agitador

PSU-10i (Biosan, Riga, Letonia). Para el ensayo de citotoxicidad se empleó DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), solución MTT de 1 mg/ml (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) disuelta en acetona (Honeywell, Charlotte, NC, EEUU) e isopropanol (Panreac Química SLU, Barcelona, España). Se leyó la absorbancia con el lector de placas Victor X3 2030 Multilabel Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, EEUU). Para realizar el ensayo de tensión de los *scaffolds* de PLA se empleó una máquina de tracción Dy34 (Adamel LHomargy Division D'instruments SA, Paris, France) y el paquete de software TestWorks 4®.

Para fabricar las membranas electrohiladas de PLLA se empleó *pellet* de PLLA (200 kDa, Inegeo, NatureWorks LLC), diclorometano (DCM) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y N,N-dimetilformamida (DMF) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Y para colagenar las membranas electrohiladas de PLLA y los pocillos para las células epiteliales primarias se empleó la solución de colágeno bovino tipo I 3 mg/ml PureCol® (Advanced BioMatrix, San Diego (CA), EEUU) y PBS (EuroClone, Milán, Italia).

Para la microscopía electrónica se empleó el microscopio electrónico de barrido JSM-5410 (Jeol, Tokio, Japón), software gratuito ImageJ/FIJI y se empleó el plug-in 'Nearest neighbour Distance' (NnD, de Yuxiong Mao).

Para preparar la solución de alginato, agarosa y CaCl₂ se empleó ácido algínico, NaCl y agua desionizada (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), HEPES (Panreac Química SLU, Barcelona, España), agarosa tipo IX-A, CaCl₂ y agua de cultivos (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), un filtro de 0,22 µm de poro Filtropur S 0.2 (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) y un agitador magnético RH Basic (IKA, Staufen, Alemania).

3.4. Material fungible

Durante los ensayos se emplearon frascos de cultivos 75 cm² (T75) (EuroClone, Milán, Italia), placas de 12, 24, 48 y 96 pocillos (EuroClone, Milán, Italia), cámaras de 8 pocillos Millicell® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y placas de 384 pocillos para PCR (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), así como tubos de PCR de 0,2 ml (Cultek, Madrid, España), tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y tubos de centrífuga de 15 ml y de 50 ml (Labbox, Barcelona, España). También se utilizaron portaobjetos y cubreobjetos (Labbox, Barcelona, España) y hojas de bisturí estériles (Heinz Herenz, Hamburgo, Alemania).

4. MÉTODOS

4.1. Fabricación y esterilización de *scaffolds* de PLA

Los *scaffolds* fueron impresos en 3D por la impresora modelo BQ Hephestos 2 con un extrusor con boquilla de 0,4 mm y usando una bobina de 100% PLA con un filamento de 1,75 mm de diámetro. Los *scaffolds* se diseñaron con forma de prismas de 7,5 mm de lado, 3 mm de espesor y una porosidad del 55%. El diseño y la generación del archivo STL se realizó con la aplicación Tinkercard™ y para hacer el laminado y la generación del archivo GCODE se empleó el software CURA 2 con los parámetros presentados en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de fabricación de los *scaffolds* con el software CURA 2.

Parámetro	Valor
Altura de cada capa	0,2 mm
Espesor total de la pared	1 mm
Número de paredes	2
Espesor del techo/fondo	0 mm
Densidad de relleno	45%
Patrón de relleno	Líneas
Velocidad de impresión	60 mm/s

Dado que su fabricación se llevó a cabo en condiciones no asépticas, los *scaffolds* se esterilizaron con lavados sucesivos en etanol disuelto a distintas concentraciones en PBS de mayor a menor (70%, 50%, 30% y 0%) para primero eliminar cualquier microorganismo contaminante con el etanol, luego ir retirando progresivamente todo el alcohol, que es tóxico para las células, y finalmente sustituirlo por PBS. Cada lavado tuvo una duración de 10 minutos en los que el tubo de centrifuga con los *scaffolds* se mantenía en un agitador a 1.200 rpm para que la solución llegase a todo el material, y se repitió 3 veces. Después de realizar los lavados, se colocaron los *scaffolds* en una placa de Petri y se dejaron 10 minutos bajo la luz UV de la campana por cada cara.

4.2. Métodos de caracterización de los *scaffolds* de PLA

4.2.1. Microscopía electrónica de barrido

En primer lugar, los *scaffolds* fueron pegados sobre portaobjetos de un material conductor y se les aplicó un recubrimiento con oro volatilizado por bombardeo iónico. A continuación, se introdujeron en la cámara de vacío del microscopio electrónico de barrido JSM-5410 (Jeol). Finalmente, las muestras se fotografiaron a una distancia de 15 mm, con un voltaje de 15 kV. Las imágenes obtenidas con el objetivo de 100x fueron procesadas mediante el software gratuito ImageJ/FIJI y se empleó el plug-in 'Nearest neighbour Distance' (NnD, de Yuxiong Mao) con el objetivo de medir el tamaño medio de los poros (Rodríguez Pérez, 2017).

4.2.2. Ensayo de tracción

Se realizó un ensayo de tracción de 3 muestras de PLA y varias probetas por muestra: 3 probetas de 1,5 mm de espesor, 3 probetas de 2,6 mm de espesor y 4 probetas de 3,1 mm de espesor. Todas ellas tenían 15,5 mm de ancho y la longitud libre entre las mordazas al inicio de cada ensayo era de 60 mm. Se utilizó la máquina de tracción Dy34 con una célula de carga de 1 kN y se aplicó en todos los casos una velocidad inicial de 10 mm/min. Los datos se recogieron mediante el paquete de software TestWorks 4®.

4.2.3. Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad fue llevado a cabo según el protocolo de Rodríguez Pérez (2017) con modificaciones. Este ensayo para medir la viabilidad celular se realizó de manera indirecta, es decir, midiendo la supervivencia de las células en presencia de un extracto del material, en este caso un medio de cultivo que permaneció en contacto con el material durante un cierto periodo de tiempo. Este tipo de ensayo permite detectar si el material libera moléculas citotóxicas al medio, ya sean fragmentos de este tras degradarse o residuos de su síntesis. Para realizar el ensayo, incubaron los *scaffolds* ya esterilizados en 1 ml de medio de proliferación de condrocitos en el incubador a 37 °C y una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24 horas y durante 7 días. Después, a una placa de 96 pocillos donde se habían sembrado condrocitos y habían estado 24 horas con medio de proliferación, se les cambió el medio por los extractos a 24 horas y 7 días. Además, como control positivo de citotoxicidad se empleó el extracto de una pieza de látex, que es tóxico para las células y no permite su supervivencia. Por otra parte, como control negativo para citotoxicidad se empleó medio de proliferación de condrocitos. Los cultivos fueron analizados a las 24, 48 y 96 horas de incubación mediante un ensayo de MTT. Para ello, primero se les retiró el medio a los pocillos y se les añadió a cada uno 100 µl de medio MTT, preparado con un 90% de DMEM y un 10% de solución MTT de 1 mg/ml, dejándolos incubar en oscuridad durante 2,5 horas. Luego se sustituyó el medio MTT de cada pocillo con 120 µl de isopropanol. Tras mantener 1 minuto en agitación, se extrajo 100µl de cada pocillo a una placa de 96 para medir su absorbancia a 550 nm en el lector de placas Victor X3 2030 Multilabel Reader.

4.3. Aislamiento y cultivo de condrocitos

Los condrocitos empleados en este trabajo fueron extraídos del cartílago articular de la rodilla de conejos para experimentos previos. Posteriormente, fueron congelados en crioviales a -195,8 °C, y para realizar este trabajo se descongelaron. En los apartados posteriores explica este proceso.

4.3.1. Aislamiento de condrocitos del cartílago articular

Los condrocitos se extrajeron del cartílago articular de la rodilla tal y como describen Sancho-Tello *et al.* (2015) y Mata *et al.* (2017). Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Para obtener estos condrocitos se sacrificó a los conejos donantes con una inyección letal en la vena auricular que contenía una sobredosis de anestesia (500 mg / iv de tiopental sódico;

Tiobarbital). El cartílago se seccionó del hueso subcondral, se cortó en cubos finos y se lavó con medio de lavado. A continuación, los cubos de cartílago se sometieron a diversas digestiones con varias enzimas. En primer lugar, el cartílago se incubó con 0,5 mg/ml de hialuronidasa durante 30 minutos a 37 °C en el baño termostatizado con agitador. Después se retiró la hialuronidasa, se añadió 1 mg/ml de pronasa y se incubó 1 hora a 37 °C en el baño termostatizado con agitador. Posteriormente, los trozos de cartílago se lavaron con el medio de lavado, se retiró el medio y se continuó con la digestión añadiendo 0,5 mg/ml de colagenasa-IA. Se incubó *overnight* en el baño termostatizado con agitador a 37 °C y la suspensión resultante se filtró a través de un filtro de nylon con poros de 70 µm de diámetro para eliminar los restos de tejidos. Las células se centrifugaron con el medio básico de condrocitos y el *pellet* resultante se resuspendió en medio de proliferación, obteniendo finalmente las células aisladas y preparadas para el cultivo de condrocitos.

4.3.2. Tripsinización, contaje y congelación celular

Los condrocitos sembrados en frascos de cultivo se tripsinizaron para despegar las células de la superficie de cultivo. Para ello se retiró el medio y se lavó con PBS para eliminar toda la solución, ya que contiene FBS y este inactiva la tripsina, y a continuación se añadieron 2 ml de tripsina en el frasco y se dejó incubar a 37 °C durante 4 minutos, ya que a esta temperatura la tripsina está activa. Durante este tiempo la tripsina va rompiendo los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis y provoca que las células dejen de estar unidas entre ellas y al frasco. Pasado ese tiempo, se añadió medio de proliferación de condrocitos con una concentración 4 veces mayor que la cantidad de tripsina, es decir 8 ml de medio, para diluir la enzima y además inactivarla con la concentración de FBS.

A continuación, se realizó un contaje celular con la tinción de azul tripán, que tiñe de azul las células con daños en la membrana, y el contador automático. Posteriormente, se centrifugó la suspensión celular a 1.200 rpm durante 5 minutos y el *pellet* se resuspendió en 95% de FBS inactivado y 5% del crioprotector DMSO. Finalmente, se realizaron viales de 1 ml con una cantidad de 1 millón a 2,5 millones de células por vial que se congelaron en primer lugar a -80 °C y posteriormente a -195,8 °C en nitrógeno líquido.

4.3.3. Descongelación y cultivo de condrocitos

Los viales se descongelan a 37 °C en el baño termostatizado e inmediatamente después de descongelarse se añade su contenido de 1 ml a frascos de cultivos con 11 ml de medio de proliferación previamente atemperado a 37 °C en el baño. Para los ensayos se descongelaron 2 viales de condrocitos de conejo de pase 4 de 1 millón de células cada uno, que se sembraron en 3 T75 y 2 viales de 1,5 millones de células cada uno de pase 2, que se sembraron en 2 T75. Al día siguiente de descongelarlas se les cambió el medio, y durante los próximos días se les fue cambiando el medio con una frecuencia de 2 o 3 días y tripsinizando, contando y sembrando en más frascos hasta que se llegó a la cantidad que se requería de células para sembrar en los *scaffolds*.

4.4. Siembra de condrocitos en *scaffolds* de PLA

El objetivo de este estudio era analizar la proliferación y la diferenciación de condrocitos de conejos sobre *scaffolds* de PLA en diferentes condiciones: condrocitos sobre *scaffolds* sin

hidrogel, condrocitos sobre *scaffolds* con un hidrogel de alginato 3% y condrocitos sobre un hidrogel de alginato 3%-agarosa 1%. Cada condición se repitió 4 veces para las células de un mismo pase, y dado que había dos cultivos de condrocitos con distinto pase, se sembraron 2 placas como la que se muestra en la Figura 6.

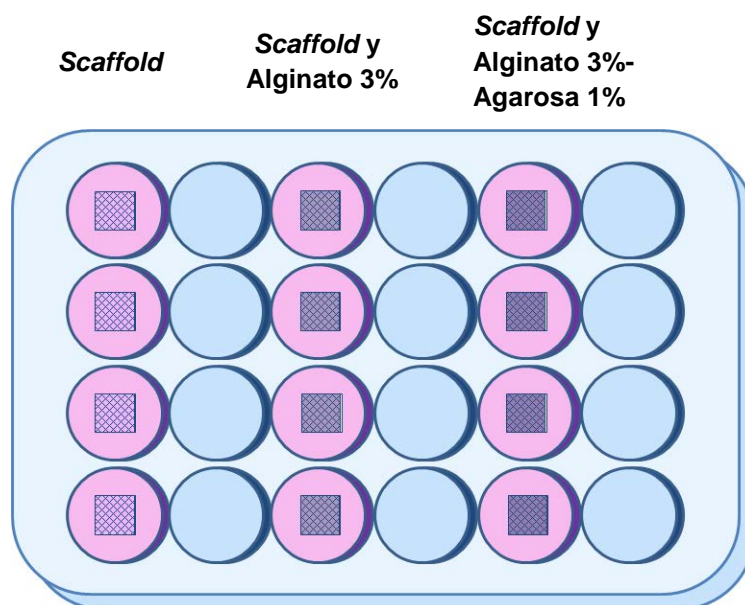


Figura 6. Esquema de los condrocitos sembrados en *scaffolds* y su distribución en la placa de 24 pocillos según las condiciones de cultivo.

En primer lugar, se realizaron las soluciones necesarias para fabricar los hidrogeles. Las soluciones de alginato se prepararon disolviendo HEPES 20 mM y 150 mM NaCl en agua desionizada. Tras calentar la mezcla a 60 °C se añadió 1,25% de ácido algínico, y se mantuvo en constante agitación en el agitador magnético a 37 °C hasta conseguir la completa disolución. Tras dejar que la solución se enfriara a temperatura ambiente se ajustó el pH a 7,4. Después se ajustó el volumen final con agua desionizada para conseguir una concentración de alginato 6% y una concentración de alginato 3%. Para preparar la solución de polimerización, se mezcló CaCl₂ 102 mM y HEPES 10 mM. Se ajustó el pH a 7,4 y se filtró la solución con un filtro de 0,22 µm. Finalmente, la agarosa se disolvió en agua de cultivos para obtener la solución de agarosa 2%.

Una vez preparadas las soluciones, los condrocitos se sembraron en cada *scaffold* con una concentración de 9 millones/ml, y como en cada *scaffold* se inyectaron 75 µl de suspensión celular, se sembraron 675.000 células por *scaffold*. Dado que en cada placa se colocan 12 *scaffolds*, se necesitó una cantidad de 8,1 millones de células para sembrar cada placa. El procedimiento para sembrar los condrocitos sobre los *scaffolds* se explica a continuación.

Primero, se tripsinizaron los frascos de cultivos y se contó cuántas células había para saber si era un número suficiente para sembrar las placas. De los 3 T75 de pase 6 había 8,2 millones de células vivas y de los 4 T75 de pase 4 había 9,2 millones de células. Dado que había más de 8,1 millones de células por pase, se procedió a sembrar. Se recogió el volumen en el que había la cantidad necesaria de células de cada pase y se centrifugó 5 minutos a 1.200 rpm. Las células que no se usaron para sembrar se congelaron. Después de la centrifugación se resuspendió el *pellet* en el volumen necesario para obtener una concentración de 9 millones/ml, en este caso los 8,1 millones de células de cada pase se resuspendieron en 0,9 ml de medio de proliferación. De esa cantidad se pusieron 75 µl cada

uno de los cuatro *scaffolds* sin hidrogel de la placa. Los 0,6 ml restantes se repartieron en dos microtubos con 0,3 ml cada uno. Se centrifugaron 5 minutos a 1.200 rpm y el *pellet* de uno de los microtubos se resuspendió en 0,3 ml de la solución de alginato 3% y el *pellet* del otro microtubo se resuspendió en 0,15 ml de alginato 6% y 0,15 ml de agarosa 2% para finalmente tener una suspensión celular en alginato 3%-agarosa 1%.

Antes de inyectar estas soluciones en sus respectivos *scaffolds*, se añadieron 10 μ l de CaCl_2 2% en los soportes donde se iba a añadir los hidrogeles, ya que el Ca^{2+} es un catión multivalente que participa en el procedimiento de entrecruzamiento iónico, por lo que el CaCl_2 2% se emplea como solución de polimerización. Una vez se añadió la solución de polimerización, se inyectaron los 75 μ l de suspensión celular en alginato 3% en 4 *scaffolds* de cada placa y 75 μ l de suspensión celular en alginato 3%-agarosa 1% en los últimos 4 *scaffolds* de cada placa. Para terminar de gelificar los hidrogeles, se dejaron las placas 30 minutos en el incubador a 37 °C y 15 minutos en campana a temperatura ambiente para que terminase de polimerizar el hidrogel. Pasado este tiempo, se añadió a cada pocillo 1 ml de medio de proliferación y se dejaron cultivando en el incubador. Se les cambió el medio a los dos días, y cuando llevaban 4 días en medio de proliferación se les retiró el medio y se les añadió medio de diferenciación, que se les fue cambiando cada 2 o 3 días.

Las dos placas con las células se fijaron con formol cuando llevaban 6 semanas en diferenciación. Se retiró el medio, se hicieron 2 lavados con PBS, se añadió formol a 4 °C y se dejó en nevera a esa temperatura durante 20 minutos, y pasado ese tiempo se retiró el formol, se lavó con PBS y se dejó en PBS hasta que se hizo la inmunofluorescencia.

4.5. Fabricación, esterilización y acondicionamiento de las membranas electrohiladas de PLLA

Las membranas electrohiladas de PLLA fueron proporcionadas por el grupo de investigación del Dr. Manuel Monleón Pradas del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT). Se fabricaron según el siguiente protocolo para fabricación de membranas con fibras no alineadas. En primer lugar, la solución de PLA para electrohilado se elaboró disolviendo *pellet* de PLLA de 200 kDa a una concentración del 10% empleando como solvente una mezcla al 70:30 (v/v) de diclorometano y N,N-dimetilformamida con una proporción 70:30.

La solución final se colocó en una jeringa con una aguja de 30G (0,16 mm de diámetro interior) conectada a una fuente de alimentación de alto voltaje. El proceso de *electrospinning* se realizó con un caudal de solución de 4 ml/h, a una distancia de 20 cm entre la punta de la aguja y el colector y 20 kV de voltaje. El fluido se expulsó de la aguja hacia una lámina de aluminio colocada en el colector conectado a tierra. Finalmente, las nanofibras se secaron en un sistema de vacío durante 48 h para eliminar las trazas de solvente.

Después de su fabricación, las membranas se cortaron con un bisturí para ajustarlas a la medida de 5 cm de largo y 2 cm de ancho de las cámaras de 8 pocillos en las que se iban a colocar. Posteriormente, dado que la fabricación de las membranas se realizó en condiciones no asépticas, se esterilizaron poniéndolas sobre placas de Petri a 20 cm de distancia de la luz UV de la cabina de flujo, y fueron irradiadas por cada cara 1 hora. A continuación, se montaron las membranas en las cámaras de 8 pocillos y se les añadió el medio de acondicionamiento durante 10 minutos. Posteriormente se les retiró el medio, se les añadió nuevo medio de acondicionamiento y se dejaron *overnight* en el incubador. Al día siguiente se les retiró el medio y se colagenaron la mitad de las membranas poniendo 300 μ l por pocillo de una dilución 1:100 de colágeno tipo I PureCol® en PBS. Se dejaron 40

minutos en el incubador a 37 °C para ayudar a adherir el colágeno a la placa y pasado ese tiempo, se hizo un lavado con PBS y se dejaron secar un mínimo de 2 horas en la campana.

4.6. Microscopía electrónica de barrido de las membranas electrohiladas de PLLA

Se realizó la caracterización de las membranas posteriormente a su fabricación, sin haber sido esterilizadas ni acondicionadas. En primer lugar, las membranas se adhirieron sobre portaobjetos de un material conductor y se les aplicó un recubrimiento con oro volatilizado por bombardeo iónico. A continuación, se introdujeron en la cámara de vacío del microscopio electrónico de barrido JSM-5410 (Jeol). Finalmente, las muestras se fotografiaron a una distancia de 7 mm, con un voltaje de 2 kV. Las imágenes obtenidas con los objetivos de 600x y 2800x fueron procesadas mediante el software gratuito ImageJ/FIJI.

4.7. Aislamiento y cultivo de células epiteliales

4.7.1. Aislamiento y cultivo de células epiteliales primarias de mucosa nasal

Se obtuvo una muestra de epitelio nasal de un paciente mediante curetaje introduciendo una cureta y rascando superficialmente la cavidad del cornete medio nasal. Inmediatamente, la biopsia se resuspendió en un microtubo con 1 ml de medio BEGM y se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm para separar las células de la parte mucosa. El *pellet* se resuspendió en 2 ml de medio BEGM intentando disgregar las aglomeraciones, y se sembró en 2 pocillos de una placa de 12 pocillos previamente colagenados con el mismo protocolo explicado en el apartado 4.5. Se les cambió el medio cada 2 o 3 días hasta que llegaron a una confluencia del 90% aproximadamente.

4.7.2. Cultivo de A549 y H460

Para los ensayos con las membranas de PLLA se descongeló 1 vial de la línea celular A549 de pase 3 y un vial de la línea celular H460 de pase +5. Cada uno de ellos se sembró en un T75 con 12 ml de medio RPMI suplementado. Al día siguiente de descongelarlas se les cambió el medio, y durante los próximos días se les fue cambiando el medio con una frecuencia de 2 o 3 días hasta que se llegó a una confluencia del 80% aproximadamente.

4.8. Siembra de A549, H460 y células epiteliales primarias en membranas electrohiladas de PLLA

El objetivo de este estudio era analizar y comparar la proliferación de células epiteliales en diferentes condiciones: sobre los pocillos de las cámaras de cultivo Millicell, sobre membranas electrohiladas de PLLA y sobre membranas electrohiladas de PLLA con colágeno. Cada condición se repitió en 8 pocillos para el mismo tipo celular, y dado que había 3 tipos celulares, se sembraron 3 tandas de placas como las que se muestran en la Figura 7.

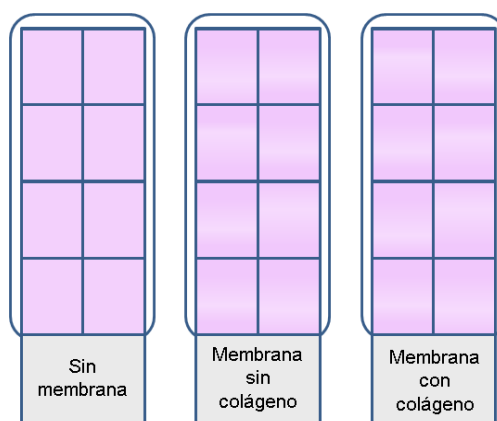


Figura 7. Esquema de la distribución de los cultivos de células epiteliales en las cámaras de 8 pocillos, con las diferentes condiciones: sin membrana, sobre membrana sin colágeno y sobre membrana con colágeno.

Las células epiteliales se sembraron con una concentración de 10.000 células/pocillo y 500 μ l/pocillo. Dado que cada tipo celular se siembra en 3 cámaras y cada una de ellas tiene 8 pocillos, se necesitaron 240.000 células de cada tipo celular para sembrar las 3 cámaras. El procedimiento para sembrar las células epiteliales se explica a continuación.

Primero, se tripsinizaron los frascos de cultivos y los pocillos y se contó cuántas células para hacer los cálculos para tenerlas en las concentraciones adecuadas. En el T75 de pase 4 (antes pase 3) de A549 había 9,7 millones de células vivas con una viabilidad del 92%, y en el T75 de pase +6 (antes pase +5) de H460 había 7,3 millones de células vivas con una viabilidad del 91%. Dado que en los dos había más de 240.000 células se procedió a sembrar. Se recogió el volumen en el que había la cantidad necesaria de células de cada línea celular y se centrifugó 5 minutos a 1.200 rpm. Las células que no se usaron para sembrar se congelaron. Después de la centrifugación se resuspendió el *pellet* en el volumen necesario para obtener una concentración de 10.000 células en 500 μ l (20.000 células/ml), en este caso las 240.000 células de cada tipo celular se resuspendieron en 12 ml de medio RPMI suplementado. De esta suspensión se repartieron 500 μ l por pocillo y se dejaron incubando a 37 °C y 5% de CO₂ en el incubador. Se les cambió el medio cada 2 o 3 días. Cuando llevaban 11 días sembradas, 4 pocillos de cada placa se fijaron con formol tal y como se explica en el apartado 4.4, y estos se utilizaron para realizar una inmunofluorescencia.

4.9. Inmunofluorescencia y marcaje con fluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcaje que permite detectar la presencia de una determinada molécula al producirse su unión con un anticuerpo marcado con fluorescencia. En el caso de los *scaffolds* con condrocitos, se estudió la presencia de agregano, colágeno tipo I y colágeno tipo II. El agregano es el proteoglicano más abundante en la matriz extracelular del cartílago y el colágeno tipo II es una proteína estructural que es el principal componente del cartílago hialino, ambos son secretados por los condrocitos y son componentes fundamentales para la estructura y la función del cartílago hialino (De Paz Lugo, 2006) (Fülöp *et al.*, 1996), mientras que el colágeno tipo I es un tipo de colágeno presente en el tejido fibroso y sintetizado por fibroblastos. Este estudio permitirá demostrar si los condrocitos están diferenciándose adecuadamente en el entorno tridimensional o si por el contrario están manteniendo su forma fibroblástica, típica de su crecimiento *in vitro* en

cultivos 2D (Schneevoigt, 2016). Tanto en los condrocitos como en las células epiteliales se realizó un marcaje fluorescente con DAPI, que permite visualizar los núcleos celulares ya que se une a regiones del DNA, y con rodamina-faloidina, que es una sonda de alta afinidad que se une a la f-actina por lo que permite ver las fibras del citoesqueleto.

Los primeros pasos del protocolo son comunes. Primero se retiró el PBS de los pocillos y se realizaron 2 lavados con el mismo tampón. Después se añadió Triton X-100 0,1%, que es un detergente iónico no surfactante, para permeabilizar la membrana celular y se dejó 5 minutos. Pasado ese tiempo se retiró y se realizaron 2 lavados con PBS. Por último, se añadió BSA 1%, que evita las uniones inespecíficas de los anticuerpos, y se dejó actuar 30 minutos, y finalmente se retiró el BSA. Posteriormente, en el caso de los condrocitos sembrados en *scaffolds*, un *scaffold* de cada condición (*scaffold*, *scaffold* con hidrogel de alginato 3% y *scaffold* con hidrogel de alginato 3%-agarosa 1%) se incubó con el anticuerpo primario anti-colágeno I a una concentración de 1:100 en el diluyente para anticuerpos EnVision™, otro *scaffold* de cada condición se incubó con el anticuerpo primario anti-colágeno II a una concentración de 1:500 en EnVision™, otro *scaffold* de cada condición se incubó con el anticuerpo primario anti-agrecano a una concentración 1:100 en EnVision™ y por último, el cuarto *scaffold* de cada condición se incubó sin ningún anticuerpo en EnVision™, ya que este permitirá tener un control del anticuerpo secundario, para determinar primero la fluorescencia inespecífica marcada por este anticuerpo y así poder detectar la presencia real de colágeno I, II y agrecano en las muestras. A todos ellos se les añadió DAPI 30 μM a una concentración 1:100, y se dejaron *overnight* en la nevera a 4 °C. Al día siguiente, se les retiró el medio y se les añadió a todos los *scaffolds* el anticuerpo secundario *anti-mouse* a una concentración 1:200 en PBS, y se dejó una hora a 4 °C. Después de esa hora se añadió a todos los pocillos faloidina a una concentración 5:200 y finalmente pasado una hora a temperatura ambiente se lavó con PBS y se analizaron las muestras en el microscopio de fluorescencia.

En el caso de las células epiteliales se añadió faloidina a una concentración de 1:100 en los 4 pocillos. Después de 1 hora a temperatura ambiente se lavó con PBS y se desmontaron las cámaras para poder añadir a las membranas, o al portaobjetos en el caso de las células epiteliales que crecen sin membrana, medio de montaje con DAPI, se les puso los cubreobjetos y se analizaron en el microscopio de fluorescencia. Para contar la cantidad de núcleos celulares se empleó el editor de gráficos Adobe Photoshop CS5.

4.10. Biología molecular

Para los cuatro pocillos restantes de las cámaras con células epiteliales se realizaron los siguientes ensayos de biología molecular.

4.10.1. Extracción y cuantificación de RNA

Para la extracción de RNA, se añadió 100 μl cloroformo (200 μl cloroformo/ 1.000 μl de trizol) a la suspensión de células epiteliales con trizol ya descongeladas para separar la fase acuosa que contiene el RNA y se centrifugó 15 minutos a 12.000 RCF 4 °C. Se recogió la fase acuosa, separándola de la fase orgánica que contiene DNA y proteínas, y se añadió a un tubo de microcentrífuga que contenía 1 μg de glucógeno que funciona de *carrier* para el RNA. Se añadió 250 μl de isopropanol (500 μl isopropanol/ 1.000 μl de trizol) para precipitar los ácidos nucleicos y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente y después 15

minutos a -80 °C para favorecer la precipitación del RNA frente a la de DNA. A continuación, se centrifugó 10 minutos 12.000 RCF 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se añadió 500 µl de etanol 75% y se centrifugó 5 minutos 7.500 RCF 4 °C y luego se desechó el sobrenadante. Este lavado con etanol se repitió otra vez. Finalmente, se dejó secar en un termobloque a 40 °C durante 10 minutos y se resuspendió en 20 µl de agua libre de RNAsas y DNAsas. A continuación, se dejó 5 minutos en el termobloque a 65 °C para diluir bien el RNA. Para determinar la pureza y cuantificar el RNA de todas las muestras, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop One atendiendo al valor de los ratios A260/280 y A260/320, que indican la presencia de ácidos nucleicos en la muestra y la presencia de sales respectivamente. Las muestras de RNA se conservaron en -80 °C hasta que se realizó la reacción de retrotranscripción.

4.10.2. Reacción de retrotranscripción

Se realizó una reacción de retrotranscripción de las muestras de RNA obtenidas de las líneas celulares A549 y H460 y de las células epiteliales primarias. La transcripción reversa o retrotranscripción (RT) es una técnica molecular que permite la síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de moléculas de mRNA utilizando la enzima transcriptasa reversa. Cada reacción contenía 2 µl de tampón 10X, 4,4µl de Cl₂Mg, 4 µl de dNTPs, 1 µl de hexámeros al azar, 0,5 µl de enzima transcriptasa reversa, 0,4 µl de inhibidor de RNAsas y 400 ng de RNA en un volumen calculado en función de la cantidad de RNA que se había extraído de cada muestra, y ajustando el volumen final a 20 µl con agua libre de RNAsas y DNAsas. Teniendo en cuenta la cantidad de RNA obtenida de cada muestra se calcularon los µl que se habían de coger para tener 400 ng de RNA, y se mezcló esta cantidad con agua hasta llegar a 7,7 µl en total. Además, se preparó un blanco (bRT) que no lleva RNA sino 7,7 µl de agua. Una vez se prepararon todas las reacciones, se pusieron en el termociclador con los siguientes ciclos de temperaturas: Una incubación a 25 °C durante 10 minutos, seguida de un ciclo a 48 °C durante 30 minutos en los que la enzima lleva a cabo la retrotranscripción y finalmente una incubación a 95 °C durante 5 minutos para inactivar la transcriptasa reversa. Se terminó con un ciclo de 4 °C hasta que el cDNA se guardó en el congelador a -20 °C hasta su uso.

4.10.3. Real Time PCR

La *Real Time* PCR permite la cuantificación de los productos de la PCR durante cada ciclo de la reacción, produciendo una medida cuantitativa de los productos de PCR acumulados durante el curso de esta. Para ello, se emplean sondas de hidrólisis que en su extremo 5' llevan conjugado un fluoróforo que actúa como donador de fluorescencia o *reporter* y una molécula aceptora en su extremo 3' que se conoce como *quencher*. La energía emitida por el *reporter* es absorbida en gran parte por el *quencher*, lo que da lugar a una señal de fluorescencia muy baja en el detector. Esta supresión de la fluorescencia ocurre hasta que ocurre la hibridación de la sonda, cuando el *quencher* se libera y por lo tanto la señal del *reporter* es captada por el detector midiendo un aumento de la fluorescencia. El ciclo *threshold* (CT) es el número de ciclos que le cuesta a cada reacción llegar a una cierta cantidad de fluorescencia. Cuando se ha obtenido el valor CT de cada reacción, se puede usar para cuantificar un nivel de expresión relativa (VanGuilder *et al.*, 2008).

En este estudio se realizó la reacción *Real Time* PCR para las muestras de cDNA obtenidas a partir de la reacción de retrotranscripción de los ensayos con las células epiteliales. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y la media del valor CT se usó para el análisis posterior. Se analizaron 3 genes seleccionados por su importante papel en el epitelio.

CDH1 (Hs01023894_m1): La E-cadherina es una proteína que pertenece a la familia de las cadherinas. Se encuentra en la membrana celular de las células epiteliales y contribuye a la adhesión celular para formar tejidos (GHR).

MUC5AC (Hs01365601_m1): MUC5AC es un tipo de proteína perteneciente a la familia de las mucinas. Contribuye a las propiedades viscosas y elásticas del moco, que son esenciales para la limpieza y protección del epitelio frente a patógenos y deshidratación (ScienceDirect).

CK20 (Hs00966063_m1): CK20 es una citoqueratina pertenece a la familia de las queratinas. Las queratinas son filamentos intermedios responsables de la integridad estructural de las células epiteliales (NCBI).

Como control endógeno se utilizó el *housekeeping gene* GAPDH (Hs99999905_m1), que es un gen con expresión constante y por tanto se empleará en el posterior análisis para normalizar los datos.

Cada reacción se realizó por triplicado en placas de 384 pocillos con un volumen final de 10 µl por pocillo: 1 µl de cDNA, 0,5 µl de sonda, 5 µl de Master Mix TaqMan™ Gene Expression 2X y 3,5 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas. Además, se incluyó un control negativo en cada lectura para confirmar la ausencia de contaminación, que lleva 1 µl de agua en vez de cDNA; así como el blanco de la RT. La reacción tuvo lugar en el termociclador QuantStudio 5 Real-Time PCR, que permite detectar y medir la fluorescencia a tiempo real, y siguió las siguientes condiciones de ciclos: en primer lugar, una etapa previa a de 50 °C durante 2 minutos para activar la acción de la enzima Amperasa Uracil N-Glicosilasa (UNG), que evita la reamplificación de productos de PCR que resultarían en falsos positivos degradando productos de PCR de amplificaciones previas en las que se ha incorporado dUTP sin degradar el DNA molde nativo, seguida de una incubación a 95 °C para disociar el enzima. A continuación, se establecieron 40 ciclos a 95 °C durante 10 segundos para desnaturalizar el DNA seguidos de una etapa de 1 minuto a 60 °C de anillamiento de los *primers* y amplificación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Resultados de la caracterización de los *scaffolds* de PLA

5.1.1. Estructura de los *scaffolds* de PLA

Los *scaffolds* de PLA impresos por la impresora BQ Hephestos 2 tienen 7,5 mm de lado, 3 mm de espesor y una porosidad del 55% (Figura 8. A). Su observación en el microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscope; SEM) permitió determinar el tamaño de los poros, que es de 1,2 mm de largo de media; y la densidad de estos por mm^2 , que es de 1 poro/ mm^2 (Figura 8. B). Se estimó que esta porosidad era adecuada para la correcta y eficiente inyección de los condrocitos y los hidrogeles en los *scaffolds* comparando con *scaffolds* empleados para experimentos anteriores con porosidades del 10 - 90%.

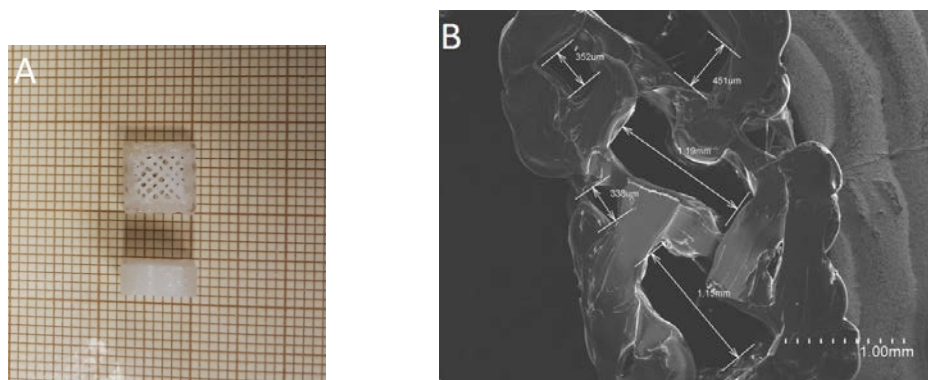


Figura 8. A) Fotografía de los *scaffolds* de cara y de perfil sobre papel milimetrado. B) Imagen obtenida en el SEM de un *scaffold* de PLA donde se aprecia la dimensión de los poros. Barra de medida: 1 mm.

5.1.2. Propiedades mecánicas de los *scaffolds* de PLA

Los datos del ensayo de tracción realizado con la máquina Dy34 con una célula de carga de 1 kN y una velocidad inicial de 10 mm/min fueron recogidos mediante el paquete de software TestWorks 4® (Figura 9).



Figura 9. Fotografía de una de las probetas de espesor 2,1 mm fracturada después de finalizar el ensayo de tracción y aún sujeta por las mordazas.

Todas las muestras habían sido impresas con el mismo material, PLA, y con los mismos parámetros de fabricación incluyendo la longitud libre y la anchura, 60 mm y 15,5 mm respectivamente. El único dato variable era el espesor, teniendo la muestra 1 un espesor de 1,5 mm, la muestra 2 un espesor de 2,6 mm y la muestra 3 un espesor de 3,1 mm. El

ensayo proporcionó datos cada décima de segundo sobre la carga aplicada (N), la extensión (mm), la tensión (MPa) y la deformación (%) hasta la rotura de la pieza. Con estos datos se pudo representar la gráfica Tensión-Deformación de cada una de las probetas de cada muestra (Figuras 10, 11 y 12), y también se pudo calcular la tensión de tracción a la rotura (σ_R), la deformación a la rotura (ϵ_R), la carga máxima en el punto de rotura, el Módulo de Young (E), la resistencia a la tracción ($\sigma_{m\acute{a}x}$), la deformación a la tensión máxima ($\epsilon_{m\acute{a}x}$), el límite elástico (σ_y) y la deformación en el límite elástico (ϵ_y) de cada una de ellas, calculando primero el valor que toma la propiedad en cada probeta y después realizando la media (Tablas 2, 3 y 4). A continuación, se muestran las distintas gráficas y valores que se obtuvieron de cada muestra.

Las 3 probetas de la muestra 1 dieron los valores de tensión y deformación mostrados en la Figura 10, y los valores de las propiedades mecánicas mostrados en la Tabla 2.

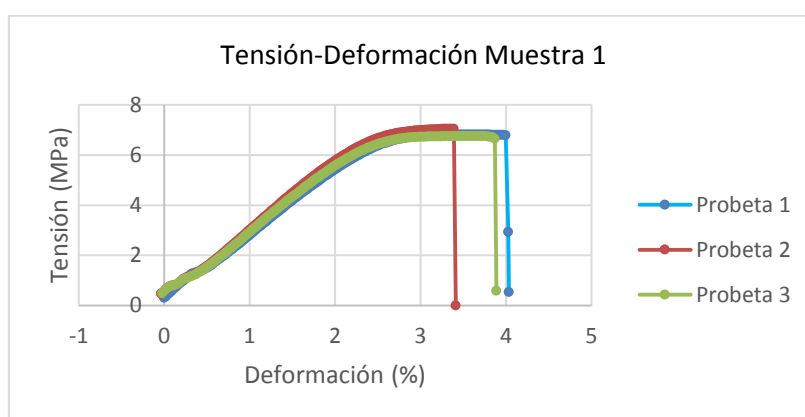


Figura 10. Gráfica que muestra la relación tensión (eje X) - deformación (eje Y) de las 3 probetas de la muestra 1.

Tabla 2. Valores medios de las propiedades mecánicas de la muestra 1 obtenidos a partir de la representación Tensión - Deformación mostrada en la Figura 10.

Propiedad	Media	Unidad
Tensión de tracción a la rotura (σ_R)	6,8 ± 0,2	MPa
Deformación a la rotura (ϵ_R)	3,8 ± 0,3	%
Carga máxima en el punto de rotura	158,8 ± 4,7	N
Módulo de Young (E)	2,6 ± 0,1	MPa
Resistencia a la tracción ($\sigma_{m\acute{a}x}$)	6,9 ± 0,2	MPa
Deformación a la tensión máxima ($\epsilon_{m\acute{a}x}$)	3,5 ± 0,1	%
Límite elástico (σ_y)	6,5 ± 0,1	MPa
Deformación en el límite elástico (ϵ_y)	2,5 ± 0,01	%

Las 3 probetas de la muestra 2 dieron los valores de tensión y deformación mostrados en la Figura 11, y los valores de las propiedades mecánicas mostrados en la Tabla 3.

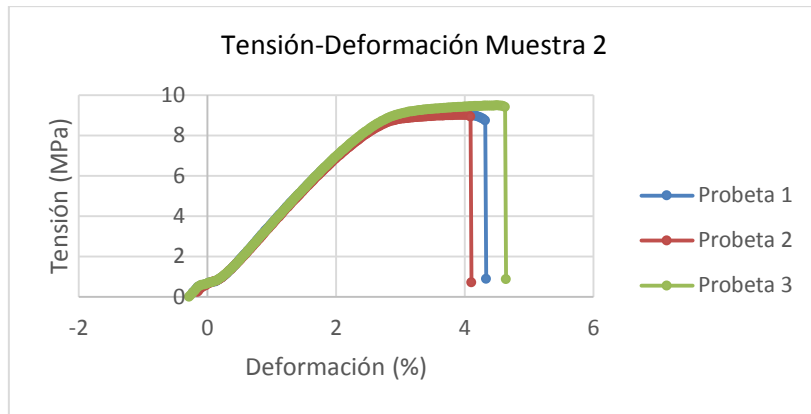


Figura 11. Gráfica que muestra la relación tensión (eje X) - deformación (eje Y) de las 3 probetas de la muestra 2.

Tabla 3. Valores medios de las propiedades mecánicas de la muestra 2 obtenidos a partir de la representación Tensión - Deformación mostrada en la Figura 11.

Propiedad	Media	Unidad
Tensión de tracción a la rotura (σ_R)	$9,0 \pm 0,3$	MPa
Deformación a la rotura (ϵ_R)	$4,3 \pm 0,3$	%
Carga máxima en el punto de rotura	$364,2 \pm 13,9$	N
Módulo de Young (E)	$3,2 \pm 0,02$	MPa
Resistencia a la tracción ($\sigma_{m\acute{a}x}$)	$9,2 \pm 0,2$	MPa
Deformación a la tensión máxima ($\epsilon_{m\acute{a}x}$)	$4,0 \pm 0,5$	%
Límite elástico (σ_y)	$8,7 \pm 0,4$	MPa
Deformación en el límite elástico (ϵ_y)	$2,7 \pm 0,1$	%

Las 4 probetas de la muestra 3 dieron los valores de tensión y deformación mostrados en la Figura 12, y los valores de las propiedades mecánicas mostrados en la Tabla 4.

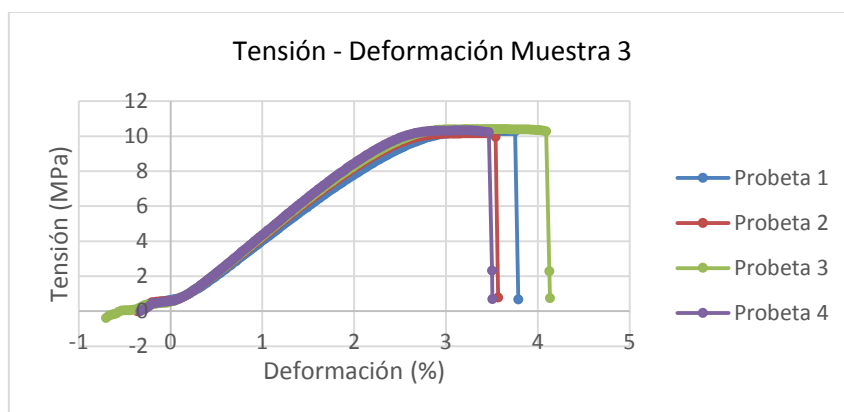


Figura 12. Gráfica que muestra la relación tensión (eje X) - deformación (eje Y) de las 4 probetas de la muestra 3.

Tabla 4. Valores medios de las propiedades mecánicas de la muestra 3 obtenidos a partir de la representación Tensión - Deformación mostrada en la Figura 12.

Propiedad	Media	Unidad
Tensión de tracción a la rotura (σ_R)	10,2 \pm 0,2	MPa
Deformación a la rotura (ϵ_R)	3,7 \pm 0,3	%
Carga máxima en el punto de rotura	489,2 \pm 7,2	N
Módulo de Young (E)	3,6 \pm 0,2	MPa
Resistencia a la tracción ($\sigma_{m\acute{a}x}$)	10,3 \pm 0,1	MPa
Deformación a la tensión máxima ($\epsilon_{m\acute{a}x}$)	3,5 \pm 0,2	%
Límite elástico (σ_y)	10,1 \pm 0,2	MPa
Deformación en el límite elástico (ϵ_y)	2,8 \pm 0,1	%

Como se aprecia en las Figuras 10, 11 y 12, todas las probetas de cada muestra tienen una curva tensión-deformación muy similar, por lo que se demuestra que la fabricación de *scaffolds* mediante impresión 3D es muy reproducible.

El Módulo de Young caracteriza el comportamiento que tiene un material elástico dependiendo de la dirección en la que se le aplique una fuerza. Dado que la tráquea es elástica, el valor del Módulo de Young tiene mucha importancia a la hora de considerar si un tipo de *scaffold* será un buen sustituto. El valor del Módulo de Young de la muestra 1 es de 2,6 \pm 0,1 MPa, el de la muestra 2 es de 3,2 \pm 0,02 MPa y el de la muestra 3 es de 3,6 \pm 0,2 MPa. Las tres constantes elásticas se encuentran dentro del rango de los valores de este módulo que tiene cartílago traqueal según la literatura. Lambert *et al.* (1991) determinan el Módulo de Young de los anillos de cartílago de la tráquea humana en el rango de 2,5 a 7,7 MPa. Por otra parte, Rains *et al.* (1992) determinan un intervalo más amplio de 1,8 \pm 2,1 a 15 \pm 5,1 MPa para el cartílago traqueal dependiendo de la edad del paciente.

Del resto de propiedades no se ha encontrado información en la literatura sobre los valores que adopta la tráquea. Dado que todas ellas tienen valores muy similares entre las tres muestras, a la hora de decantarse por un espesor para los *scaffolds* se decidiría en función del espesor más similar al del tejido a reemplazar, además de que sería conveniente realizar este tipo de ensayo para calcular las características mecánicas de la tráquea.

5.1.3. Citotoxicidad de los *scaffolds* de PLA

El ensayo de citotoxicidad proporcionó los datos presentados en la Figura 13.

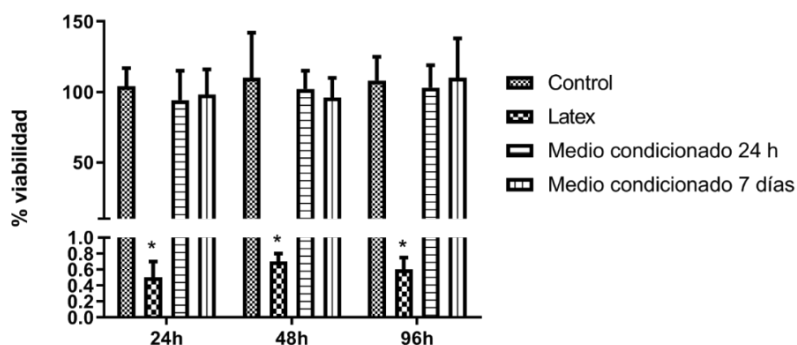


Figura 13. Resultados del ensayo de citotoxicidad donde se presenta el % de viabilidad de viabilidad celular al haber incubado las células con los distintos medios condicionados durante 24, 48 y 96 horas.

En los resultados del ensayo no se aprecian diferencias significativas entre las distintas condiciones evaluadas y el control negativo ya que todos los valores se encuentran en torno al 100% de viabilidad. El control positivo muestra un resultado esperado ya que la viabilidad celular cuando los condrocitos han sido incubados con el medio condicionado con látex es cercano al 0% de viabilidad.

Esto permite determinar que el ácido poliláctico no es citotóxico, al menos a corto plazo, lo que es positivo ya que quiere decir que su uso no tendrá efectos negativos sobre la viabilidad celular si se emplea en ingeniería de tejidos para reparar o sustituir tejidos, lo cual es una de las características deseadas en este tipo de materiales.

5.2. Resultados del cultivo de condrocitos sobre los *scaffolds* de PLA

Se sembraron condrocitos de conejo con una concentración de 9 millones/ml en *scaffolds* de PLA, en *scaffolds* con hidrogel de alginato 3% y en *scaffolds* con hidrogel de alginato 3% - agarosa 1% en un volumen de 75 μ l. Estuvieron en medio de proliferación 4 días y en medio de diferenciación 6 semanas.

5.2.1. Confluencia y fenotipo de los condrocitos sobre los *scaffolds* de PLA

Después de 6 semanas en diferenciación, se realizó una inmunofluorescencia de 8 *scaffolds* de cada condición. De 2 de ellos se analizó la expresión de colágeno I, de otros 2 la expresión de colágeno II y de otros 2 la expresión de agregcano. Los 2 restantes sirvieron para realizar el control del anticuerpo secundario y así regular los niveles de exposición e intensidad del microscopio de fluorescencia para el canal verde, que es en el que se detecta la expresión de estas proteínas. Además, se marcaron los núcleos celulares con DAPI y las fibras f-actina del citoesqueleto con faloidina. Finalmente, los resultados se observaron con el microscopio de fluorescencia Leica DM4000 B y se tomaron fotografías con el objetivo de 63x, empleando aceite de inmersión, con el paquete de software LAS AF para realizar las fotografías. De cada condición se tomaron fotos de entre 28 y 87 campos.

La faloidina permitió observar si los condrocitos tenían fibras de estrés, que son típicas de las células indiferenciadas. Se observó que en al menos el 89% de los campos fotografiados de todas las condiciones los condrocitos presentaban fibras de estrés (Figura 14).

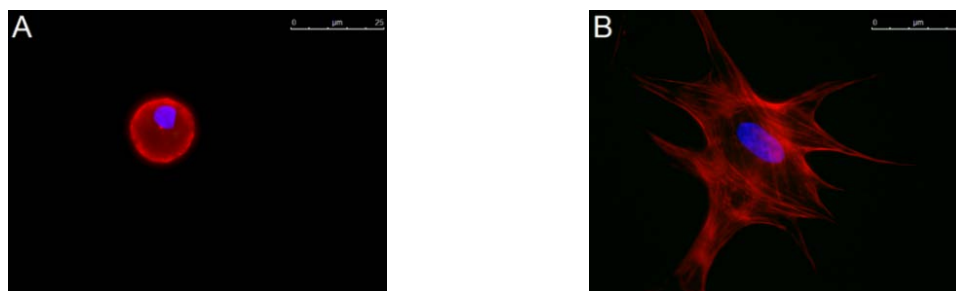


Figura 14. A) Condrocito sin fibras de estrés. B) Condrocito con fibras de estrés. En ambas imágenes se ve el núcleo marcado con DAPI (azul) y las fibras de f-actina del citoplasma marcadas con faloidina (rojo). Barra de medida: 25 µm.

Además, de todos los campos fotografiados de cada condición se calculó el porcentaje de expresión de colágeno I, colágeno II y agrecano (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de campos de cada condición (*Scaffold*: *Scaffold* sin hidrogel; Alg: *Scaffold* con hidrogel de alginato 3%; Alg-ag: *Scaffold* con hidrogel de alginato 3%-agarosa 1%) en los que hay expresión o no de colágeno I, colágeno II y agrecano.

Expresión	Colágeno I			Colágeno II			Agrecano		
	<i>Scaffold</i>	Alg	Alg-ag	<i>Scaffold</i>	Alg	Alg-ag	<i>Scaffold</i>	Alg	Alg-ag
Sí	30%	22,5%	46%	48%	70%	85%	23%	45%	75%
No	70%	77,5%	54%	52%	30%	15%	77%	55%	25%

Los valores de la tabla 5 muestran que en los casos en los que los condrocitos están incluidos en un hidrogel producen más cantidad de colágeno II y agrecano, que son componentes característicos de los condrocitos del cartílago hialino, en comparación con los que están sembrados en el *scaffold* sin hidrogel. Esto indica que el hidrogel ayuda al mantenimiento del fenotipo condral y evita que se desdiferencien, probablemente debido a que ayuda a que crezcan en un entorno tridimensional similar a la matriz extracelular. Más concretamente, la expresión de ambos factores es más alta cuando el hidrogel llevaba agarosa que cuando no la llevaba, por lo que al parecer la agarosa contribuye a la similitud del hidrogel con la matriz. Sin embargo, en el caso del colágeno I, característico de tejidos fibrosos, se expresa más en el caso de los hidrogeles de alginato y agarosa.

Teniendo en cuenta estos resultados, no parece que se pueda confirmar que el crecimiento en este tipo de *scaffolds* permita la correcta diferenciación a condrocitos y la formación de cartílago, aunque se ha de tener en cuenta que las imágenes realizadas son solo de las partes superficiales de los soportes, ya que no se han podido realizar fotografías del interior.

A continuación, se muestra una imagen representativa de cada condición, teniendo en cuenta que se ha tomado como expresión significativa aquellos valores en los que haya expresión en al menos el 45 % de los campos (Figura 15).

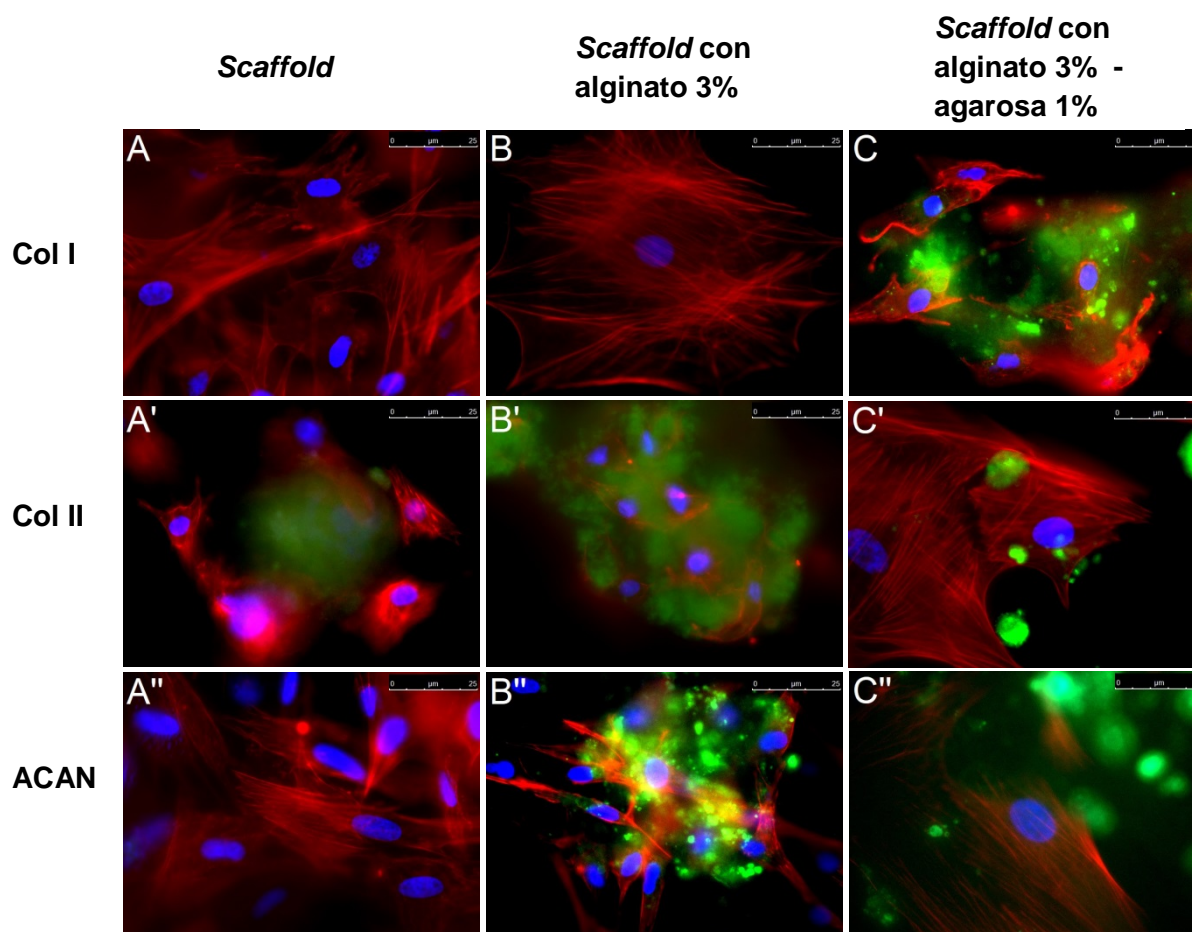


Figura 15. Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia de condrocitos de conejo en cultivo 3D sobre *scaffolds* en 3 condiciones distintas: sembrados sobre *scaffolds* sin hidrogel (A, A' y A''), sembrados sobre *scaffolds* con un hidrogel de alginato 3% (B, B' y B'') y sembrados sobre *scaffolds* con un hidrogel de alginato 3% - agarosa 1% (C, C' y C''). En las distintas inmunofluorescencias se han marcado el colágeno I (verde; A, B y C), el colágeno II (verde; A', B' y C') y el agregcano (verde; A'', B'' y C''). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul) y los filamentos del citoesqueleto de f-actina están marcados con faloidina (rojo). Barras de escala: 25 μ m.

5.3. Resultados del aislamiento y cultivo de células epiteliales primarias

Las células epiteliales primarias obtenidas a partir de biopsias nasales sembradas en dos pocillos con colágeno llegaron a confluencia cuando llevaban sembradas una semana. Presentaban la morfología típica de adoquinado propia de las células epiteliales y se realizaron fotografías con el microscopio óptico a 10x (Figura 16).

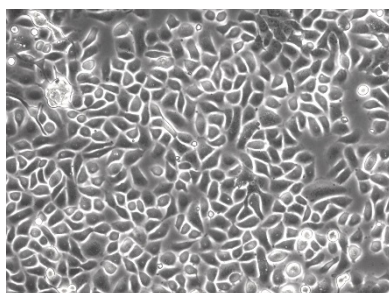


Figura 16. Imagen a 10x de las células epiteliales primarias sembradas durante 1 semana en un pocillo de la placa de 12 pocillos.

5.4. Estructura de las membranas electrohiladas de PLLA

La microscopía electrónica de barrido de las membranas electrohiladas de PLLA permitió obtener imágenes a 600x y 2800x donde se aprecia el entramado de hilos de polímero que forman el electrohilado (Figura 17).

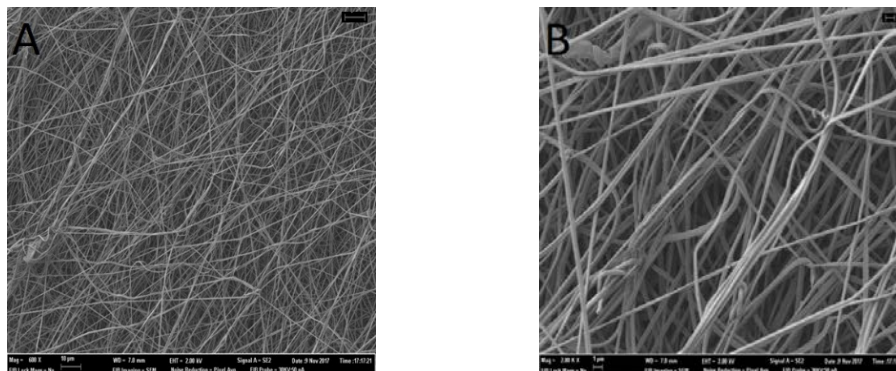


Figura 17. Imágenes obtenidas en el SEM de una membrana de PLLA a 600x (A) y a 2800x (B). Barras de medida: 10 μm (A) y 1 μm (B).

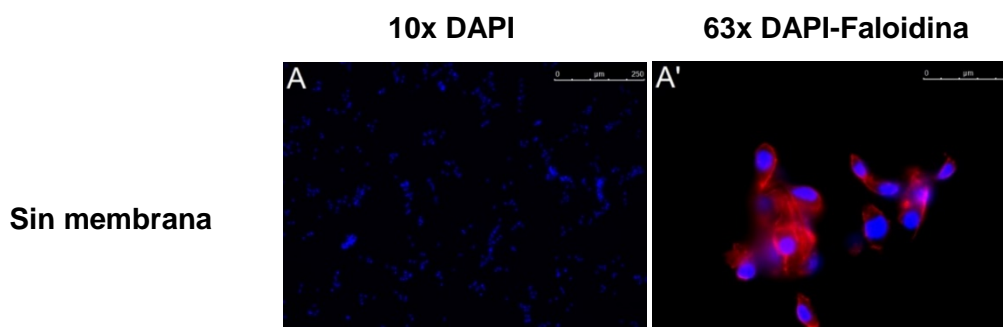
5.5. Resultados del cultivo de las células epiteliales sobre las membranas electrohiladas de PLLA

La línea epitelial alveolar A549, la línea epitelial pulmonar H460 y las células epiteliales primarias se sembraron con una concentración de 10.000 células/pocillo en 3 condiciones distintas en cámaras Millicell de 8 pocillos: directamente sobre los pocillos, sobre membranas electrohiladas de PLLA sin colágeno y sobre las mismas membranas con colágeno. Las líneas celulares se mantuvieron 11 días en medio RPMI suplementado para proliferación de células epiteliales, y los cultivos primarios en medio BEGM.

5.5.1. Confluencia y morfología de las células epiteliales sobre las membranas electrohiladas de PLLA

Después de 11 días de proliferación, se realizó un marcaje fluorescente de 4 pocillos de cada cámara de todas las condiciones. Se marcaron los núcleos celulares con DAPI y las fibras f-actina del citoesqueleto con faloidina. Finalmente, los resultados se observaron con el microscopio de fluorescencia Leica DM4000 B y se tomaron fotografías a 10x y a 63x, empleando aceite de inmersión, con el paquete de software para realizar las fotos LAS AF.

En el caso de la línea celular A549 se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 18.



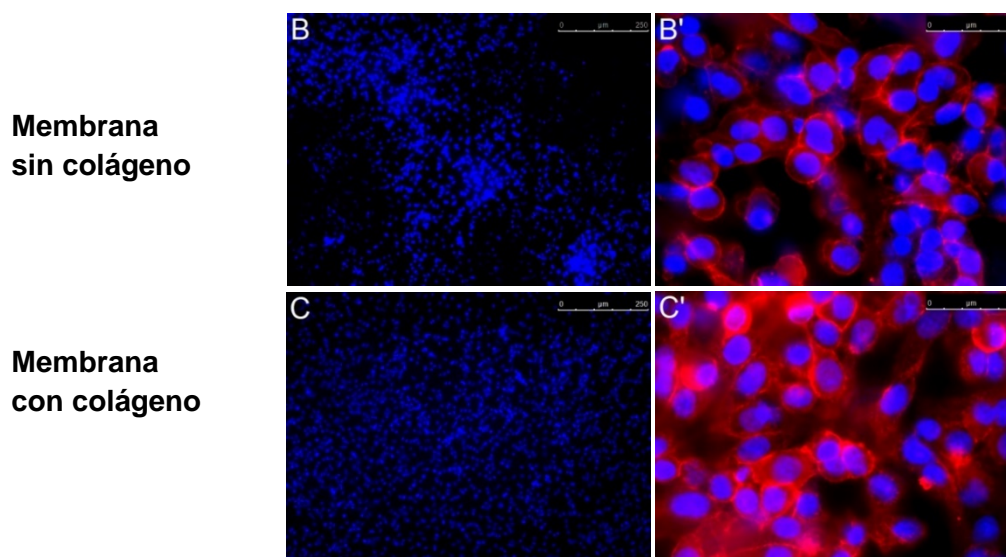


Figura 18. Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia de la línea celular A549 en 3 condiciones distintas a dos aumentos diferentes: crecidas en las cámaras Millicell sin membranas a 10x (A) y a 63x (A'), crecidas sobre una membrana de PLLA sin colágeno a 10x (B) y a 63x (B') y crecidas sobre una membrana de PLLA con colágeno a 10x (C) y a 63x (C'). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul) y los filamentos del citoesqueleto de f-actina están marcados con faloidina (rojo). Barras de escala: 250 µm (A, B y C) y 25 µm (A', B' y C').

En las imágenes realizadas con el objetivo de 10x (Figura 18. A, B y C) se observó una importante diferencia entre el número de núcleos que había por campo en el caso de las células crecidas directamente en las cámaras y en el caso de las células crecidas sobre las membranas. Esta diferencia se cuantificó empleando el editor de gráficos Adobe Photoshop CS5, contando los núcleos presentes en 3 campos distintos a 10x y en cada condición, y se calculó la media y la desviación estándar.

En el caso de las células sembradas en la cámara sin membrana se cuantificó una media de $330 \pm 129,7$ células por cada campo. Por otra parte, las células sembradas sobre la membrana de PLLA sin colágeno presentaban una concentración media de $1.320 \pm 145,0$. Por último, las células sembradas sobre la membrana de PLLA con colágeno tenían una distribución de $1.212 \pm 255,0$ células por campo. Estos resultados confirman que hay una mayor proliferación de la línea celular A549 si se siembran sobre membranas sin colágeno y sobre membranas con colágeno con respecto a si se siembran en las cámaras Millicell sin membrana, aproximadamente hay 76 y 70 veces más células respectivamente. No se considera que haya una diferencia significativa entre la confluencia de las células sobre membranas con colágeno y sobre membranas sin colágeno.

Por otra parte, en las imágenes a 63x (Figura 18. A', B' y C') donde las células están marcadas con faloidina y DAPI, se aprecia que cuando han sido sembradas sobre las membranas de PLLA muestran la típica morfología de la línea celular A549 ya que se observa la formación de una monocapa de células cuboidales y poligonales que aparecen unidas entre ellas (Foster *et al.*, 1998). Por el contrario, en el caso de las que han sido sembradas sobre la cámara Millicell, no forman una monocapa al haber menos confluencia y la forma deja de ser tan poligonal para pasar a ser un poco más alargada.

En el caso de la línea celular H460 se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 19.

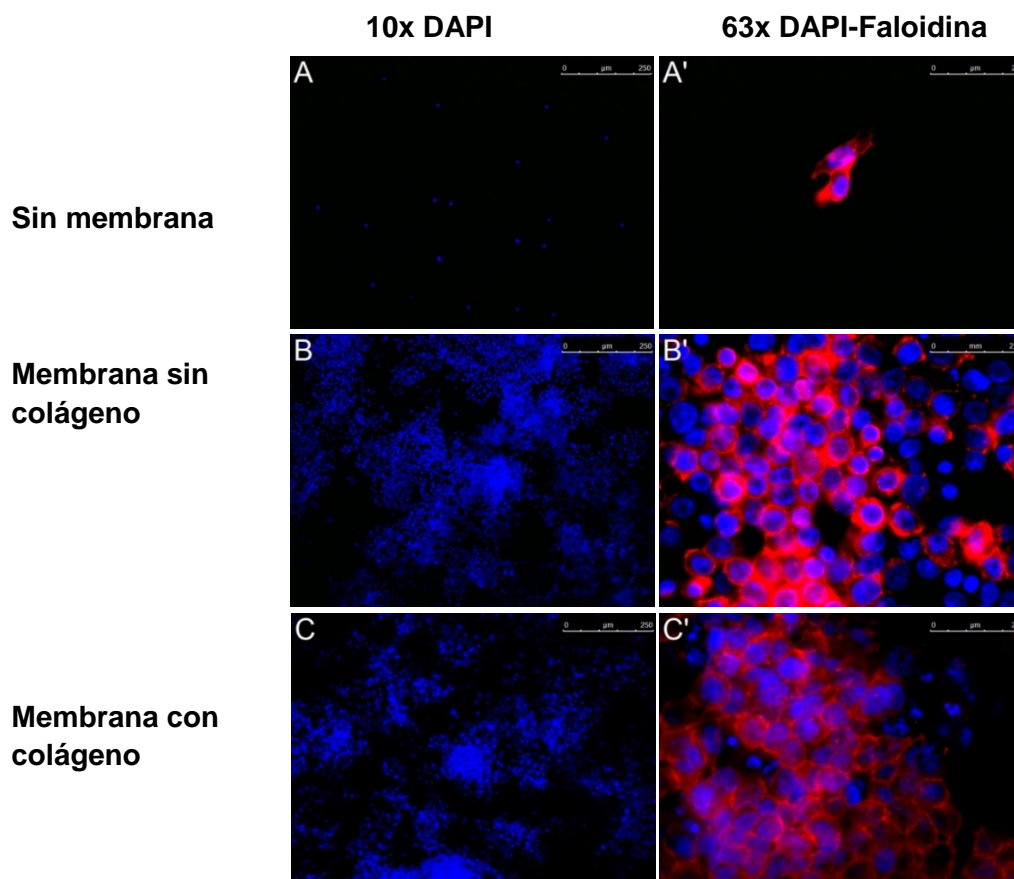


Figura 19. Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia de la línea celular H460 en 3 condiciones distintas a dos aumentos diferentes: crecidas en las cámaras Millicell sin membranas a 10x (A) y a 63x (A'), crecidas sobre una membrana de PLLA sin colágeno a 10x (B) y a 63x (B') y crecidas sobre una membrana de PLLA con colágeno a 10x (C) y a 63x (C'). Los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul) y los filamentos del citoesqueleto de f-actina están marcados con faloidina (rojo). Barras de escala: 250 μm (A, B y C) y 25 μm (A', B' y C').

En las imágenes a 10x (Figura 19. A, B y C) se observan las mismas diferencias que se observaron en las imágenes de las células A549. Se aprecia una importante diferencia entre el número de núcleos que hay por campo entre las células sembradas directamente en las cámaras y las células sembradas sobre las membranas. Como ya se hizo anteriormente, esta diferencia se cuantificó empleando el editor de gráficos Adobe Photoshop CS5, contando los núcleos presentes en 3 campos distintos a 10x y en cada condición, y se calculó la media y la desviación estándar.

Se cuantificó una media de $17 \pm 8,6$ células por cada campo en el caso de las células sembradas en la cámara sin membrana. Por otra parte, las células sembradas sobre la membrana de PLLA sin colágeno presentaban una concentración media de $1.522 \pm 420,1$ células por campo. Por último, las células sembradas sobre la membrana de PLLA con colágeno tenían una distribución de $1.720 \pm 593,3$ células por campo. Estos resultados confirman que hay una mayor proliferación de la línea celular H460 si se siembran sobre membranas sin colágeno y sobre membranas con colágeno con respecto a si se siembran en las cámaras Millicell sin membrana, aproximadamente hay 88 y 99 veces más células

respectivamente. Como ocurre con la línea A549, no se considera que haya una diferencia significativa entre la confluencia celular sobre membranas sin colágeno y con colágeno.

En las imágenes a 63x (Figura 19. A', B' y C'), donde las células están marcadas con faloidina y DAPI, también se aprecian resultados similares a los de la línea celular A549. En las células sembradas sobre las membranas de PLLA, las células mantienen su morfología característica poligonal formando una monocapa muy compacta en este caso. Por el contrario, cuando las células han sido sembradas sobre la cámara Millicell, hay mucha menos confluencia, lo que no permite que se formen monocapas, y además su forma es más alargada.

Estos resultados muestran que las células epiteliales de las líneas celulares A549 y H460 cultivadas sobre membranas de PLLA son capaces de adherirse adecuadamente y proliferar, tapizando la superficie las mismas, lo que indica que el material es adecuado para la supervivencia de este tipo de células.

De las células epiteliales primarias se tomaron imágenes con el objetivo de 45x. En este caso también se marcaron los núcleos con DAPI y las fibras de f-actina con faloidina. Se aprecia que hay más número de células en el caso de las membranas colagenadas que cuando la membrana no lleva colágeno (Figura 20).

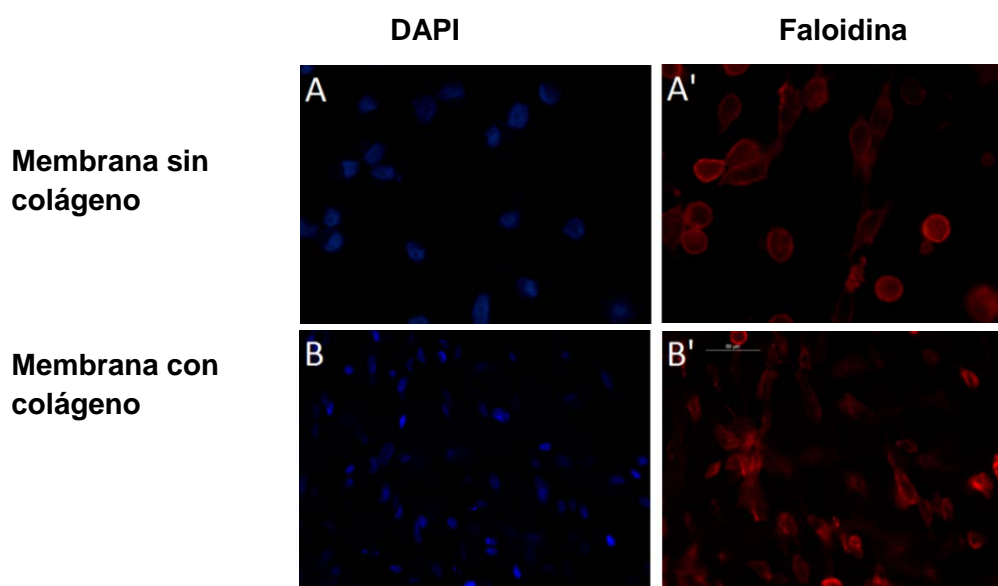


Figura 20. Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia de las células epiteliales primarias a 45x en 2 condiciones distintas con dos marcajes diferentes: crecidas en membrana sin colágeno y con los núcleos marcados con DAPI (azul) (A), crecidas en las mismas condiciones y con el citoplasma marcado con faloidina (rojo) (A'), crecidas en membrana con colágeno y con los núcleos marcados con DAPI (azul) (B) y crecidas en las mismas condiciones y con el citoplasma marcado con faloidina (rojo) (B'). Barra de escala (indicada en la imagen B'): 50 μ m.

5.5.2. Análisis relativo de la expresión génica de las células epiteliales

Para cuantificar los resultados de la *Real Time* PCR se empleó el método para cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$. Tal y como explican VanGuilder *et al.* (2008) este método asume que la reacción ocurre con el 100% de eficacia, por lo que en cada ciclo de PCR la cantidad de producto se duplica. El CT es el número de ciclos que realiza cada reacción hasta alcanzar una cantidad arbitraria de fluorescencia. Este método también supone que

hay un gen que se expresa a un nivel constante entre las muestras, en este caso el GAPDH, que es empleado como control endógeno.

Una vez que se recopila el valor de CT para cada reacción, se puede usar para generar un nivel de expresión relativo. En primer lugar, se miden los niveles de CT de un gen de interés y del gen de control endógeno. Para cada muestra, se calcula la diferencia en los valores de CT para el gen de interés y el control endógeno (el Δ CT). A continuación, la resta de la condición de control Δ CT de la condición tratada Δ CT produce la $\Delta\Delta$ CT. El valor negativo de esta resta, el $-\Delta\Delta$ CT, se usa como el exponente de 2 en la ecuación y representa la diferencia en el número de ciclos "corregidos" al umbral. La conversión exponencial proviene del hecho de que la reacción duplica la cantidad de producto por ciclo. Este análisis se realizó para los resultados de la *Real Time* PCR de las muestras A549, H460 y las células epiteliales primarias.

En las células A549 (Figura 21 se observa que sí que hay expresión de E-cadherina (CDH1) en las 3 condiciones, por lo que las células sí que se están adhiriendo entre ellas formando epitelio. Sin embargo, en el caso del control también expresan CK20 y MUC5AC, pero en los casos en los que las células han crecido sobre las membranas no hay expresión de estos genes. Esto indica que pese a empezar a crecer y adherirse, aún no han empezado a diferenciarse.

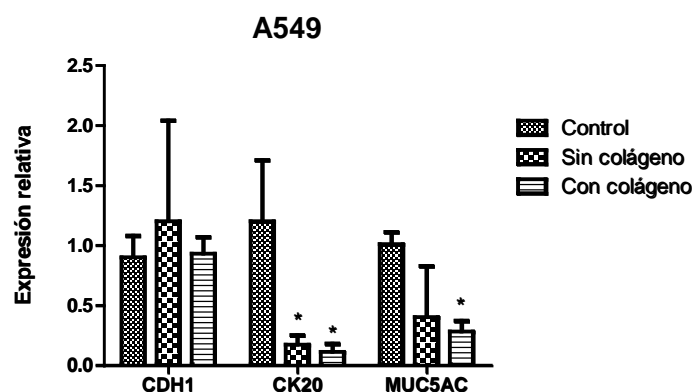


Figura 21. Expresión relativa de los genes CDH1, CK20 y MUC5AC en las células A549 crecidas en las cámaras de tipo Millicell (Control), crecidas sobre las membranas electrohiladas de PLLA sin colágeno (Sin colágeno) y crecidas sobre estas membranas con colágeno (Con colágeno).

En las células H460 los resultados de la *Real Time* PCR no muestran expresión de CDH1, CK20 y MUC5AC. La ausencia de expresión de E-cadherina indica que las células no tienen un fenotipo epitelial, sino mesenquimal. Por lo que no serán empleadas para regeneración de mucosa respiratoria.

Por otra parte, en las células epiteliales primarias (Figura 22) se observan resultados similares a los de la Figura 21, dado que sí que hay expresión de E-cadherina en las 3 condiciones, por lo que las células sí que se están adhiriendo entre ellas formando epitelio. Incluso hay una sobreexpresión cuando la membrana ha sido tratada con colágeno. Por otra parte, los valores de expresión de CK20 y MUC5AC no son altos, lo que indica que pese a empezar a crecer y adherirse, aún no han empezado a diferenciarse.

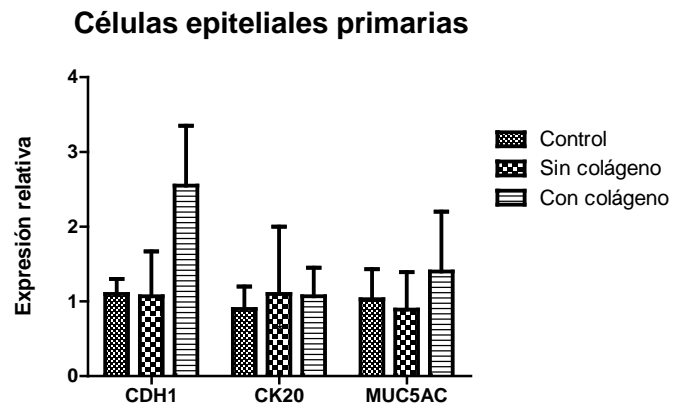


Figura 22. Expresión relativa de los genes CDH1, CK20 y MUC5AC en las células epiteliales primarias crecidas en las cámaras de tipo Millicell (Control), crecidas sobre las membranas electrohiladas de PLLA sin colágeno (Sin colágeno) y crecidas sobre estas membranas con colágeno (Con colágeno).

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permitieron extraer las siguientes conclusiones.

1. El ácido poliláctico podría ser un polímero adecuado para ser usado como soporte para regeneración de vías aéreas debido a que los *scaffolds* empleados son biocompatibles y no presentan toxicidad para las células. Además, pueden ser fabricados con distintas estructuras y formas que variarán sus propiedades mecánicas, por lo que pueden adaptarse a las diferentes partes de las vías aéreas imitando sus características.
2. Los condrocitos de conejo sembrados en los *scaffolds* de PLA, obtenidos mediante impresión 3D, con hidrogeles expresan proteínas propias del cartílago hialino como colágeno II y agregano, por lo que al parecer pueden recuperar parte de su fenotipo condral, principalmente cuando se combina el *scaffold* con el hidrogel de alginato y agarosa. A pesar de que la morfología de los condrocitos es de aspecto indiferenciado y presentan fibras de estrés, se plantea la hipótesis de que en zonas inferiores a la superficie y en el interior del hidrogel pueden presentar un aspecto más condral.
3. Las células epiteliales de mucosa nasal obtenidas a partir de biopsia se adhieren y proliferan adecuada y rápidamente sobre pocillos de una placa de cultivo tratados con colágeno, adquiriendo un fenotipo epitelial y estableciendo un cultivo primario.
4. Las líneas celulares A549 y H460 sembradas sobre membranas de PLLA, independientemente de si han sido tratadas con colágeno, son capaces de adherirse adecuadamente y proliferar tapizando la superficie las mismas, lo que indica que el material es adecuado para el crecimiento de células del epitelio. Se ha comprobado además que las células de la mucosa respiratoria sí que proliferan en estos soportes, lo que significa que se podrían emplear células de los mismos pacientes para regenerar su epitelio respiratorio.
5. La línea celular H460 no presenta expresión de CDH1, MUC5AC y CK20, por lo que a pesar de proliferar adecuadamente sobre las membranas electrohiladas de PLLA, no adopta un fenotipo epitelial sino mesenquimal. Sin embargo, tanto la línea celular A549 como las células epiteliales primarias expresan CDH1, y aunque no presenten expresión significativa de MUC5AC y CK20, los valores de CDH1 podrían significar que las células están proliferando y no se han diferenciado aún, por lo que no se descarta la expresión de estos genes propios de la mucosa respiratoria si se cultivan durante un periodo más largo.

Por tanto, el uso de ácido poliláctico como soporte para condrocitos y células epiteliales presenta una potencial capacidad para la regeneración de vías aéreas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AGARWAL, S., WENDORFF, J. H., & GREINER, A. (2008). Use of *electrospinning* technique for biomedical applications. *Polymer*, 49(26), 5603-5621. doi:10.1016/j.polymer.2008.09.014
- AHMED, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105-121. doi:10.1016/j.jare.2013.07.006
- ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION). (n.d.). A-549 VIM RFP (ATCC® CCL-185EMT™). Recuperado de <http://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/All/CCL-185EMT.aspx>
- ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION).. (n.d.). NCI-H460 [H460] (ATCC® HTB-177™). Recuperado de http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-177.aspx?geo_country=es#characteristics
- BALL, M. & PADALIA, D. (2019). Anatomy, Airway. *StatPearls*. USA: StatPearls Publishing LLC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459258/>
- BRAND-SABERI, B. E., & SCHÄFER, T. (2013). Trachea: Anatomy and physiology. *Thoracic Surgery Clinics*, 24(1), 1-5. doi:10.1016/j.thorsurg.2013.09.004
- BURDETT, E., & MITCHELL, V. (2011). Anatomy of the larynx, trachea and bronchi. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 12(8), 335-339. doi:10.1016/j.mpaic.2011.05.002
- BUSTAMANTE-MARIN, X. M., & OSTROWSKI, L. E. (2016). Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(4). doi:10.1101/cshperspect.a028241
- CHENG, T., CARPENTER, D., COHEN, S., WITSELL, D., & FRANK-ITO, D. O. (2017). Investigating the effects of laryngotracheal stenosis on upper airway aerodynamics. *The Laryngoscope*, 128(4). doi:10.1002/lary.26954
- DA SILVA, D., KADURI, M., POLEY, M., ADIR, O., KRINSKY, N., SHAINSKY-ROITMAN, J., & SCHROEDER, A. (2018). Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. *Chemical Engineering Journal*, 340, 9-14. doi:10.1016/j.cej.2018.01.010
- DE PAZ LUGO, P. (2006). *Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares posible tratamiento de enfermedades degenerativas mediante la dieta*. Granada: Editorial de la Universidad de Granada. Recuperado de <http://hera.ugr.es/tesisugr/16442349.pdf>
- DE VOS, P., LAZARJANI, H. A., PONCELET, D., & FAAS, M. M. (2014). Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 67-68, 15-34. doi:10.1016/j.addr.2013.11.005
- ENGELS, E. A., PFEIFFER, R. M., FRAUMENI, J. F., KASISKE, B. L., ISRANI, A. K., SNYDER, J. J., et al., LIN, M. (2011). Spectrum of Cancer Risk Among US Solid Organ Transplant Recipients. *Jama*, 306(17), 1891. doi:10.1001/jama.2011.1592
- ERICKSON, A. G., LAUGHLIN, T. D., ROMEREIM, S. M., SARGUS-PATINO, C. N., PANNIER, A. K., & DUDLEY, A. T. (2018). A Tunable, Three-Dimensional In Vitro Culture Model of Growth Plate Cartilage Using Alginate Hydrogel Scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, 24(1-2), 94-105. doi:10.1089/ten.tea.2017.0091
- FISHMAN, J. M., WILES, K., LOWDELL, M. W., COPPI, P. D., ELLIOTT, M. J., ATALA, A., & BIRCHALL, M. A. (2014). Airway tissue engineering: An update. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 14(10), 1477-1491. doi:10.1517/14712598.2014.938631

- FOSTER, K. A., OSTER, C. G., MAYER, M. M., AVERY, M. L., & AUDUS, K. L. (1998). Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*, 243(2), 359-366. doi:10.1006/excr.1998.4172
- FU, N., ZHANG, X., SUI, L., LIU, M., & LIN, Y. (2017). Application of Scaffold Materials in Cartilage Tissue Engineering. *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine Cartilage Regeneration*, 21-39. doi:10.1007/978-3-319-51617-2_2
- FÜLÖP, C., CS-SZABÓ, G., & GLANT, T. T. (1996). Species-specific alternative splicing of the epidermal growth factor-like domain 1 of cartilage aggrecan. *Biochemical Journal*, 319(3), 935-940. doi:10.1042/bj3190935
- GAO, M., ZHANG, H., DONG, W., BAI, J., GAO, B., XIA, D., FENG, B., CHEN, M., HE, X., YIN, M., XU, Z., WITMAN, N., FU, W. & ZHENG, J. (2017). Tissue-engineered trachea from a 3D-printed scaffold enhances whole-segment tracheal repair. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-05518-3
- GHR (GENETICS HOME REFERENCE). (n.d.). CDH1 gene, cadherin. Recuperado de <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CDH1>
- GOMBOTZ, W. R., & WEE, S. (1998). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31(3), 267-285. doi:10.1016/s0169-409x(97)00124-5
- GRILLO, H. C. (1994). Slide tracheoplasty for long-segment congenital tracheal stenosis. *The Annals of Thoracic Surgery*, 58(3), 613-620. doi:10.1016/0003-4975(94)90714-5
- GUO, B., & MA, P. X. (2018). Conducting Polymers for Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 19(6), 1764-1782. doi:10.1021/acs.biomac.8b00276
- HAYKAL, S., SALNA, M., WADDELL, T. K., & HOFER, S. O. (2014). Advances in Tracheal Reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*, 2(7). doi:10.1097/gox.0000000000000097
- HO, A. S., & KOLTAL, P. J. (2008). Pediatric Tracheal Stenosis. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 41(5), 999-1021. doi:10.1016/j.otc.2008.04.006
- HONORÉ, I., & BURGEL, P. (2016). Primary ciliary dyskinesia in adults. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 33(2), 165-189. doi:10.1016/j.rmr.2015.10.743
- IZAL, I., ARANDA, P., SANZ-RAMOS, P., RIPALDA, P., MORA, G., GRANERO-MOLTÓ, F., DEPALINE, H., GÓMEZ-RIBELLES, J.L., GALLEGO, G., FERRER, V., OCHOA, A., GARCÍA-AZNA, J.M., ANDREU, E.J., MONLEÓN-PRADAS, M., DOBLARÉ, M. & PRÓSPER, F. (2012). Culture of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on of poly(l-lactic acid) scaffolds: Potential application for the tissue engineering of cartilage. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 21(8), 1737-1750. doi:10.1007/s00167-012-2148-6
- JAKOBSEN, K. K., GRØNHØJ, C., JENSEN, D. H., FISCHER-NIELSEN, A., HJULER, T., & BUCHWALD, C. V. (2017). Mesenchymal stem cell therapy for laryngotracheal stenosis: A systematic review of preclinical studies. *Plos One*, 12(9). doi:10.1371/journal.pone.0185283
- JUNGBLUTH, P., MOLL, G., BAIGUERA, S., & MACCHIARINI, P. (2011). Tissue-Engineered Airway: A Regenerative Solution. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 91(1), 81-93. doi:10.1038/clpt.2011.270
- KNOWLES, M. R., ZARIWALA, M., & LEIGH, M. (2016). Primary Ciliary Dyskinesia. *Clinics in Chest Medicine*, 37(3), 449-461. doi:10.1016/j.ccm.2016.04.008
- LAMBERT, R.K., BAILE, E. M., MORENO, R., BERT, J., & PARE, P. D. (1991). A method for estimating the Young's modulus of complete tracheal cartilage rings. *Journal of Applied Physiology*, 70(3), 1152-1159.

- LEE, D. Y., PARK, S. A., LEE, S. J., KIM, T. H., OH, S. H., LEE, J. H., & KWON, S. K. (2015). Segmental tracheal reconstruction by 3D-printed *scaffold*: Pivotal role of asymmetrically porous membrane. *The Laryngoscope*, 126(9). doi:10.1002/lary.25806
- LEE, J. Y., PARK, J. H., SON, S. J., HAN, M., KIM, G., KANG, S. S., CHOI, S. H., & CHO, D. (2017). Evaluation of Immunosuppressive Therapy Use for Tracheal Transplantation with Trachea-Mimetic Bellows *Scaffolds* in a Rabbit Model. *BioMed Research International*, 2017, 1-6. doi:10.1155/2017/5205476
- MACCHIARINI, P., JUNGEBLUTH, P., GO, T., ASNAGHI, M. A., REES, L. E., COGAN, T. A., DODSON, A., MARTORELL, J., BELLINI, S., PARNIGOTTO, P. P., DICKINSON, S. C., HOLLANDER, A.P., MANTERO, S., CONCONI, M. T., & BIRCHALL, M. A. (2008). Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *The Lancet*, 372(9655), 2023-2030. doi:10.1016/s0140-6736(08)61598-6
- MAHAPATRO, A., & SINGH, D. K. (2011). Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 55. doi:10.1186/1477-3155-9-55
- MALLICK, S. P., RASTOGI, A., TRIPATHI, S., & SRIVASTAVA, P. (2016). Strategies on process engineering of chondrocyte culture for cartilage tissue regeneration. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(4), 601-610. doi:10.1007/s00449-016-1724-4
- MATA, M., MILIAN, L., OLIVER, M., ZURRIAGA, J., SANCHO-TELLO, M., LLANO, J. J., & CARDA, C. (2017). In Vivo Articular Cartilage Regeneration Using Human Dental Pulp Stem Cells Cultured in an Alginate *Scaffold*: A Preliminary Study. *Stem Cells International*, 2017, 1-9. doi:10.1155/2017/8309256
- MAUGHAN, E., LESAGE, F., BUTLER, C. R., HYND, R. E., HEWITT, R., JANES, S. M., DEPREST, J.A., & DE COPPI, P. (2016). Airway tissue engineering for congenital laryngotracheal disease. *Seminars in Pediatric Surgery*, 25(3), 186-190. doi:10.1053/j.sempedsurg.2016.02.012
- MCDANIEL, L. S., POYNOT, W. J., GONTHIER, K. A., DUNHAM, M. E., & CROSBY, T. W. (2018). Image-Based 3-Dimensional Characterization of Laryngotracheal Stenosis in Children. *OTO Open*, 2(1). doi:10.1177/2473974x17753583
- MIECZKOWSKI, B., & SEAVEY, B.F. (2019). Anatomy, Head and Neck, Trachea. *StatPearls*. USA: StatPearls Publishing LLC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448070/>
- NAIR, S., NILAKANTAN, A., SOOD, A., GUPTA, A., & GUPTA, A. (2015). Challenges in the Management of Laryngeal Stenosis. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*, 68(3), 294-299. doi:10.1007/s12070-015-0936-2
- NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION). (n.d.). KRT20 keratin 20 [Homo sapiens (human)]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54474>
- NIBIB (NATIONAL INSTITUTE OF BIOMEDICAL IMAGING AND BIOENGINEERING). (2013). Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa. Recuperado de: <https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/ingenier%C3%ADa-de-tejidos-y-medicina-regenerativa-0>
- NOFAR, M., SACLIGIL, D., CARREAU, P. J., KAMAL, M. R., & HEUZEY, M. (2019). Poly (lactic acid) blends: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 307-360. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.002
- ORIVE, G., PONCE, S., HERNÁNDEZ, R., GASCÓN, A., IGARTUA, M., & PEDRAZ, J. (2002). Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*, 23(18), 3825-3831. doi:10.1016/s0142-9612(02)00118-7

- RAINS, J. K., BERT, J. L., ROBERTS, C. R., & PARE, P. D. (1992). Mechanical properties of human tracheal cartilage. *Journal of Applied Physiology*, 72(1), 219-225.
- RODRÍGUEZ PÉREZ, E. (2017). Diseño de nuevos biomateriales basados en redes poliméricas interpenetradas de ácido hialurónico y polímeros acrílicos. *Universitat Politècnica De València*. doi:10.4995/thesis/10251/90632. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10251/90632>
- ROSS, M. H. & PAWLINA, W. *Histología: Texto y Atlas*. (5a ed.). México: Editorial Médica Panamericana
- SAN MARTÍN, J., & CAUSSADE, S. (2012). Evaluación funcional de la vía aérea. *Neumología Pediátrica*, 7(2), 61-66.
- SANCHO-TELLO, M., FORRIOL, F., GASTALDI, P., RUIZ-SAURÍ, A., LLANO, J. J., NOVELLA-MAESTRE, E., ANTOLINOS-TURPÍN, C.M., GÓMEZ-TEJEDOR, J.A., GÓMEZ RIBELLES, J.L. & CARDA, C. (2015). Time Evolution of in Vivo Articular Cartilage Repair Induced by Bone Marrow Stimulation and Scaffold Implantation in Rabbits. *The International Journal of Artificial Organs*, 38(4), 210-223. doi:10.5301/ijao.5000404
- SCHNEEVOIGT, J., FABIAN, C., LEOVSKY, C., SEEGER, J., & BAHRAMSOLTANI, M. (2016). In Vitro Expression of the Extracellular Matrix Components Aggrecan, Collagen Types I and II by Articular Cartilage-Derived Chondrocytes. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 46(1), 43-50. doi:10.1111/ahe.12230
- SCIENCEDIRECT. (n.d.). MUC5AC. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/muc5ac>
- TIMMAN, S. T., SCHOEMAKER, C., LI, W. W. L., MARRES, H. A. M., HONINGS, J., MORSHUIS, W. J., VAN DER HEIJDEN, E. H. F. M., & VERHAGEN, A. F. T. M. (2018). Functional outcome after (laryngo)tracheal resection and reconstruction for acquired benign (laryngo)tracheal stenosis. *Annals of Cardiothoracic Surgery*, 7(2), 227-236. doi:10.21037/acs.2018.03.07
- VANGUILDER, H. D., VRANA, K. E., & FREEMAN, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44(5), 619-626. doi:10.2144/000112776
- WAIN, J. C. (2009). Postintubation Tracheal Stenosis. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 21(3), 284-289. doi:10.1053/j.semtcvs.2009.08.001
- WALLES, T., GIÈRE, B., MACCHIARINI, P., & MERTSCHING, H. (2004). Expansion of chondrocytes in a three-dimensional matrix for tracheal tissue engineering. *The Annals of Thoracic Surgery*, 78(2), 444-448. doi:10.1016/j.athoracsur.2004.02.122
- WANG, S., ZHANG, H., ZHU, L., ZHEN, J., LIU, J., & XU, Z. (2015). Surgical management of congenital tracheal stenosis associated with tracheal bronchus and congenital heart disease. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 49(4), 1201-1206. doi:10.1093/ejcts/ezv317
- WANNER, A., SALATHÉ, M., & O'RIORDAN, T. G. (1996). Mucociliary clearance in the airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154(6), 1868-1902. doi:10.1164/ajrccm.154.6.8970383
- WELSCH, U. (2014). *Sobbota: Histología*. (3a ed.). México: Editorial Médica Panamericana
- ZARRINTAJ, P., MANOUCHEHRI, S., AHMADI, Z., SAEB, M. R., URBANSKA, A. M., KAPLAN, D. L., & MOZAFARI, M. (2018). Agarose-based biomaterials for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 187, 66-84. doi:10.1016/j.carbpol.2018.01.060