



Universidad de Oviedo

**Máster Universitario en Investigación en
Medicina**

**“Reconstrucción de defectos segmentarios
mandibulares mediante ingeniería tisular”**

**Alba Novoa Gómez
Oviedo, 20 de Julio de 2011**

ISBN 978-84-09-00310-5



Universidad de Oviedo

**Máster Universitario en Investigación en
Medicina**

**“Reconstrucción de defectos segmentarios
mandibulares mediante ingeniería tisular”**

Trabajo Fin de Máster

Dña. Alba Novoa Gómez D. Luis Manuel Junquera Gutiérrez D. Juan Sebastián López-Arranz



D. LUIS MANUEL JUNQUERA GUTIÉRREZ, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Oviedo, Departamento de Cirugía y Especialidades/área de Estomatología.

D. JUAN SEBASTIÁN LÓPEZ-ARRANZ Y ARRANZ, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valladolid, Departamento de Cirugía y Especialidades/área de Estomatología.

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Máster presentado por Doña Alba Novoa Gómez, titulado “Reconstrucción de defectos segmentarios mandibulares mediante ingeniería tisular”, realizado bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Junquera Gutiérrez, dentro del Máster en Investigación en Medicina por la Universidad de Oviedo, reúne a nuestro juicio las condiciones necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Máster en la Universidad de Oviedo.

Y para que así conste dónde convenga, firman la presente certificación en Oviedo a 13 de Julio de 2011.

Vº Bº

Vº Bº

Fdo. D. LUIS MANUEL JUNQUERA

Fdo. JUAN SEBASTIÁN LÓPEZ-ARRANZ

Director/Tutor del Proyecto

Cotutor del Proyecto

A mis padres y mi hermana, por ser mi gran apoyo en esta vida.

A mis abuelos, que “aunque en el cielo hoy no hay estrellas, yo se muy bien que ahí están”, y en especial a mi abuelo Luis que, sin quererlo, me inculcó el amor por la Medicina.

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Reparación de defectos óseos.....	9
1.1.1 Injertos óseos.....	9
1.1.2 Ingeniería tisular.....	11
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL Y MÉTODO.....	20
3.1 Animales de experimentación.....	21
3.2 Elaboración y análisis del scaffold.....	21
3.3 Diseño y elaboración de la “camisa” de soporte del scaffold.....	23
3.3.1 Selección del material.....	23
3.3.2 Diseño de la forma de la “camisa”	25
3.4 Diseño morfológico del scaffold.....	26
3.5 Aplicación del “constructo” en animal vivo.....	26
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Elaboración y análisis del scaffold.....	29
4.2 Diseño y elaboración de la “camisa” de soporte del scaffold.....	30
4.3 Diseño morfológico del scaffold.....	34
4.4 Aplicación del “constructo” en animal vivo.....	34

5. DISCUSIÓN.....	36
5.1 Elaboración, morfología y análisis del scaffold.....	37
5.2 Diseño y elaboración de la “camisa” de soporte del scaffold.....	43
5.3 Aplicación del “constructo” en animal vivo.....	45
6. CONCLUSIONES.....	51
7. BIBLIOGRAFÍA.....	53

1. INTRODUCCIÓN

1.1 REPARACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS

1.1.1 INJERTOS ÓSEOS

La reparación de los defectos óseos ha sido, y sigue siendo, objeto de investigación en prácticamente todos los ámbitos de la cirugía. Las técnicas usadas en la actualidad para subsanar esta necesidad de hueso pasan por el uso de biomateriales, injertos y por la ingeniería tisular.

El primer injerto óseo autólogo recogido por la literatura data de 1820, realizado por Von Waiter. Posteriormente, otros importantes autores han sentado, divulgado y perfeccionado las bases científicas de este tipo de injertos.

- **Funciones de los injertos óseos**
 - **Osteogénesis**

Este término hace referencia a la formación de hueso nuevo sin indicación del origen celular. Cuando se forma hueso sobre el injerto o a su alrededor, éste puede originarse en el propio injerto (gracias a células que sobreviven al tratamiento del mismo) o bien en células del huésped. Con un adecuado manejo pueden sobrevivir células en la superficie de los injertos corticales y esponjosos, siendo estas células clave para la formación de callo óseo en las primeras cuatro a ocho semanas tras la implantación. El hueso esponjoso, debido a su mayor superficie, puede albergar más células aquiescentes y tiene mayor capacidad para formar hueso que el injerto de tipo cortical (Drosse et al., 2008; Kanczler et al., 2008).

- **Osteoinducción**

Consiste en el reclutamiento de células de tipo mesenquimal que pueden diferenciarse hacia células formadoras de hueso. Está mediada por factores provenientes del injerto y es escasa en los injertos de tipo mineralizado (cuya capacidad osteoinductora viene dada por las células vivas que portan) y muy importante en los no mineralizados. La matriz ósea contiene diversas proteínas morfogenéticas, las cuales inducen la diferenciación de las células mesenquimales en células formadoras de hueso (Allori et al., 2008). Un buen estado del lecho sobre el que asienta el injerto osteoinductor es clave para su éxito, ya que éste depende del reclutamiento de células del huésped.

Sin embargo, la osteoinducción no es una propiedad exclusiva de la matriz ósea y sus proteínas, ya que recientemente ha sido descrita para los aloinjertos óseos esterilizados y conservados y para diversos biomateriales, como puede ser el titanio.

- **Osteoconducción**

Es el proceso tridimensional de crecimiento de brotes vasculares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras desde el lecho del receptor al interior del injerto. Este proceso puede ocurrir por una neoformación ósea activa por osteoinducción o bien pasivamente sin la participación del propio injerto.

Este proceso no ocurre de manera aleatoria, si no que sigue un patrón espacial ordenado y predecible, determinado por la estructura del injerto, el

aporte vascular desde los tejidos colindantes, el ambiente mecánico y la presencia de otros biomateriales (Abukawa et al., 2006).

1.1.2 INGENIERÍA TISULAR

Pese a que la evolución científica y tecnológica ha hecho posible el desarrollo de numerosos biomateriales, como pueden ser cerámicas, metales o polímeros sintéticos, ninguno de ellos ha conseguido superar al “gold standard” establecido por los autoinjertos.

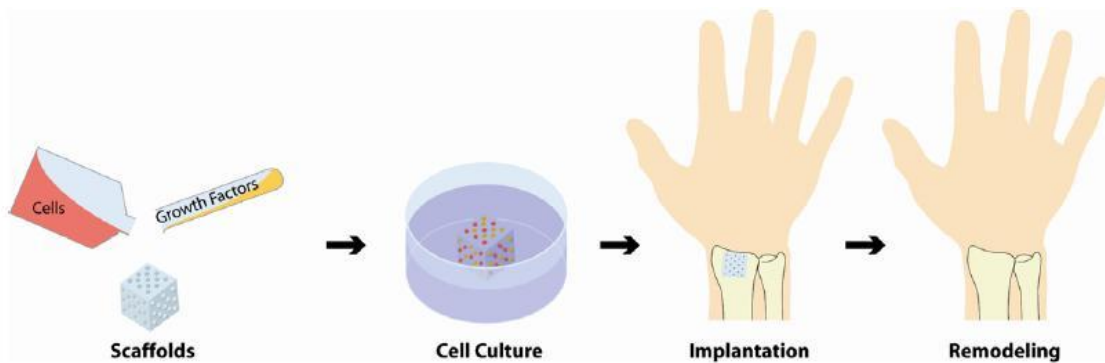


Figura 1: Pasos básicos en ingeniería tisular (Drosse I et al., 2008)

Actualmente existen numerosas líneas de investigación encaminadas a desarrollar materiales híbridos que contengan células con capacidad osteoformadora, así como materiales con funciones biológicas para reparar aquellas regiones con pérdida ósea. En este contexto, la ingeniería tisular aborda el tratamiento de los defectos óseos desde tres perspectivas no excluyentes (Handschel et al., 2006):

a) Implante directo de células osteoformadoras aisladas o previamente cultivadas:

Células individuales o bien agregados celulares insertados en la zona a reparar, con o sin matrices o "scaffold".

b) Implante de matrices tridimensionales con células osteoformadoras cultivadas:

Las células autólogas o heterólogas son cultivadas en soportes que se transplantan al lecho cuando han alcanzado la fase osteoprodutora.

c) Regeneración ósea in situ:

La formación de nuevo hueso es inducida por matrices específicas o estímulos externos que estimulan las células del huésped para alcanzar la osteoformación.

En resumen, la ingeniería tisular extracorporal o in vitro requiere tres elementos básicos: células osteoformadoras, factores de crecimiento y matrices extracelulares.

- **Líneas celulares**

En ingeniería tisular se han utilizado tanto células autólogas como heterólogas, con diferentes grados de diferenciación, siendo empleadas con éxito tanto células diferenciadas como células totipotentes de origen embrionario, así como células multipotentes denominadas células madre mesenquimales. En los últimos años, la ingeniería tisular ha incorporado a su labor un nuevo protagonista: la reprogramación celular (Nakagawa M et al., 2008). Gracias a ello, las células adultas diferenciadas pueden ser genéticamente modificadas y convertidas en células pluripotentes (iPS cells).

- **Células madre mesenquimales, células multipotentes o células madre adultas**

Pueden obtenerse de diversos tejidos (médula ósea, grasa, pared vascular, sangre, placenta, ligamento periodontal, periostio, pulpa dental y hueso trabecular) y su característica esencial es la capacidad de diferenciarse hacia distintas líneas celulares, como pueden ser hueso, cartílago, tendón o grasa (Bruder et al., 1999; Meyer et al., 2006). Esta diferenciación está mediada por numerosas hormonas y citoquinas y no todas las células mesenquimales de cualquier procedencia tienen la capacidad de diferenciarse a todos los tejidos citados (Fig.2).

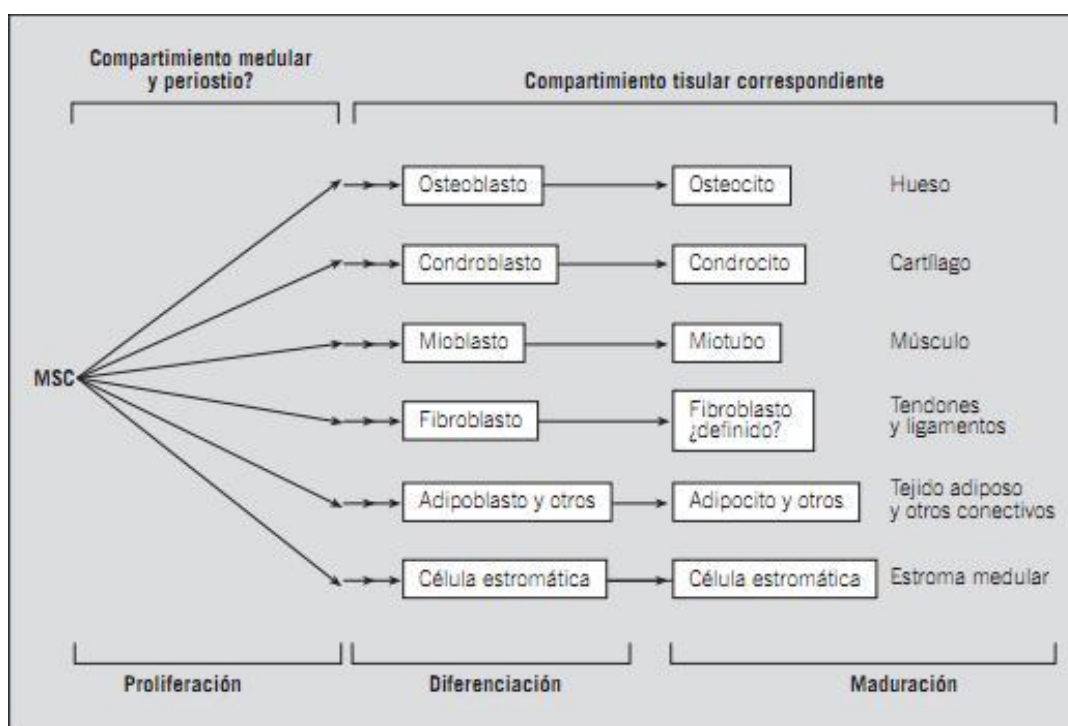


Figura 2: Líneas de diferenciación de las células madre mesenquimales (Becerra et al., 2001).

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) juegan aquí un papel esencial en la diferenciación hacia osteoblastos. Cuando se alcanza la caracterización fenotípica de

osteoblasto maduro, las células son capaces de sintetizar matriz ósea capaz de mineralizarse. Además, estos osteoblastos maduros deben expresar FA, sintetizar colágeno y osteocalcina.

Dependiendo de su procedencia pueden clasificarse en:

-Derivadas de la médula ósea (BMDPCs):

Habitualmente obtenidas de la médula ósea de la cresta ilíaca. Su principal limitación es la imposibilidad para obtener un número suficiente de células mediante la aspiración. Con los protocolos adecuados de cultivos pueden diferenciarse hacia osteoblastos, condrocitos o adipocitos, pero sólo un 50% de las células aisladas son multipotentes. Presentan positividad para los marcadores CD29, CD44, CD105 y CD90 y un marcado fenotipo osteoblástico, pero la matriz ósea inmadura producida por ellas tiende a mineralizarse débilmente.

-Derivadas del tejido adiposo (ADPCs):

Su ventaja es la facilidad de obtención de un número grande de células con baja morbilidad, con una capacidad de diferenciación hacia linaje osteoblástico similar al de las BMDPCs.

-Derivadas del periostio (PDPCs):

Tienen mayor capacidad proliferativa y plasticidad que las BMDPCs. La morbilidad derivada de su obtención puede ser mínima durante un acto de cirugía oral.

- **Células madre totipotentes o embrionarias**

Derivadas del blastocisto y con capacidad de diferenciarse hacia cualquier tejido del organismo. Para alcanzar la diferenciación hacia osteoblastos deben cultivarse en un medio con dexametasona, glicerol-fosfato y ácido ascórbico.

Su principal ventaja es su capacidad ilimitada para desarrollar células osteoblásticas, que no decrece con el tiempo. Como principales inconvenientes se describen el riesgo de cancerización y los problemas éticos y morales que pueden derivarse de su obtención a partir de embriones (Cancedda et al., 2003).

Una variante son las llamadas células madre somáticas pluripotentes, obtenidas a partir del cordón umbilical, que pueden diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos, condroblastos, células hematopoyéticas y neurales, y parecen no presentar riesgo de cancerización (Handschel et al., 2006).

- **Células diferenciadas**

Debido al conocimiento de que la regeneración ósea depende esencialmente de la presencia de osteoblastos activos, el uso de osteoblastos maduros autólogos representa una acertada estrategia para la ingeniería tisular del hueso. Carecen de riesgo de rechazo, no son objeto de debate ético, su obtención no genera una excesiva morbilidad y se han abanderado como el tipo celular más utilizado en el momento actual para el cultivo de hueso (Soucacos et al., 2008). Su principal desventaja radica en el escaso número de células con capacidad de expansión en comparación con las células madre.

○ **Células modificadas genéticamente**

Recientemente se han estudiado células genéticamente alteradas, en un intento de evaluar aspectos teóricos de la ingeniería tisular, como pueden ser las líneas celulares del osteosarcoma, líneas celulares inmortales y clones celulares no transformados. Al margen de su potencial carcinogénico y su impredecibilidad, estas células pueden tener un ilimitado potencial de replicación y diferenciación, por lo que podrían ser una interesante arma futura para la ingeniería ósea. En este sentido, el concepto de reprogramación celular y la obtención de las células iPS configuran la más moderna esperanza de la ingeniería tisular (Nakagawa et al., 2008; Aoi et al., 2008).

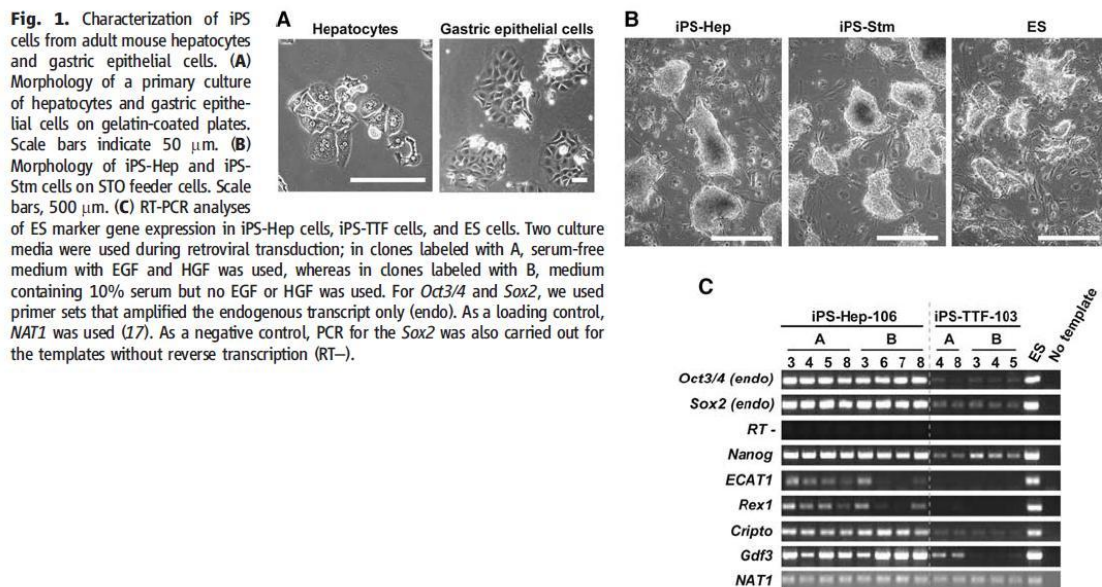


Figura 3: Método de obtención de iPS según la escuela japonesa (Aoi Et al., 2008)

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los objetivos generales de nuestra investigación persiguen alcanzar una reparación “ad integrum” de un defecto segmentario mandibular en ovejas experimentales. Para ello elaboramos un “scaffold” a partir de la sangre de la propia oveja en el que irán embebidas las células osteogénicas obtenidas mediante técnicas de cultivo in vitro.

Los defectos mandibulares se consideran como críticos cuando carecen de una capacidad de regeneración espontánea, por lo que su presencia perdurará durante toda la vida del animal. Este concepto fue introducido en la literatura científica por Schmitz y Hollinger a finales de los años ochenta. Como normal general se admite que si tras la génesis de un defecto óseo no se produce una regeneración completa en las subsiguientes 52 semanas, se puede garantizar que esta no acontecerá en el futuro. Sin embargo, las dimensiones que los defectos óseos deben presentar para ser consideradas como críticas varían en función del animal de experimentación, peso y edad del mismo.

Para algunos autores (Kessler P et al., 2004) la eliminación o mantenimiento del periostio también podría condicionar las dimensiones de un defecto crítico.

En nuestro estudios esta discusión sobre las dimensiones del defecto crítico mandibular en las ovejas, quedan soslayadas por la naturaleza segmentaria, es decir, la ruptura completa de la continuidad ósea de los defectos que se pretenden generar.

Empero la génesis de este tipo de defectos, conlleva una situación experimental que obliga a tener en consideración diferentes aspectos que constituyen los **objetivos específicos** del presente estudio. A saber:

- Necesidad del mantenimiento de las dimensiones del defecto engendrado al objeto de posibilitar una proliferación celular con invasión vascular.
- Superar la carga mecánica del área extirpada mediante “soportes” y fijaciones rígidas, que posibiliten una reparación del defecto.
- Reproducir preoperatoriamente de forma tridimensional el defecto a generar quirúrgicamente al objeto de elaborar un “scaffold” perfectamente ajustable.

Sobre este último objetivo se centra la labor investigadora del presente trabajo.

La hipótesis principal (Ho) de nuestro estudio no es otra que la siguiente:

“Es posible la reproducción tridimensional prequirúrgica de un defecto segmentario mandibular de oveja, para la elaboración de estructuras de transporte del material osteoprodutor perfectamente ajustadas al defecto”.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la reproducción de los defectos segmentarios mandibulares se obtuvieron tres mandíbulas de oveja asturiana estandar racial no definido, procedentes del matadero de Cangas de Onís. El peso “premortem” de las ovejas oscilaba entre 55 y 66 kg.

Las tres mandíbulas fueron procesadas manualmente eliminando todos los tejidos blandos adheridos y sumergidas durante 48 horas en una solución de hipoclorito sódico al 5%. Posteriormente fueron secadas al medio ambiente y llevadas al Parque Tecnológico de Gijón para su procesamiento por la empresa *Prodintec*.

3.2 ELABORACIÓN Y ANÁLISIS DEL SCAFFOLD

Para la elaboración del scaffold se procedió a una extracción de 10 ml de sangre por venopunción a una oveja asturiana de 64 kg de peso. Se trataba de una oveja considerada como estandar racial no definido cruce de varias razas entre las que predominan la Lacha y la gallega, pero al fin y al cabo sin raza definida. En cuanto a su origen se trataba de una oveja nacida en el *SERIDA* y mantenida en régimen extensivo, maximizando los tiempos de pastoreo.

Para la manipulación del animal, se siguieron las pautas establecidas por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, que se corresponden con los principios ICLAS y a la directiva 86/609/CEE, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, publicada el 18 de diciembre de 1986 en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas, así como el Real Decreto

223/1988/BOE del 14 de marzo de 1988 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

A partir de la sangre obtenida de la oveja se procedió a mantenerla durante 30 minutos a 37°C para que se produjera la retracción del *clot* de fibrina. A continuación, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El suero obtenido (5 ml) fue entonces cruzado con 0,5 ml de glutaraldehído al 25% de concentración (Merck, Alemania) y la mezcla resultante fue transferida a una jeringa de 5 ml.

Esta solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, hasta alcanzar la solidificación. A continuación se introdujo en el congelador, manteniéndose a -70°C toda la noche. Tras este período de congelación, la jeringa se cortó y la solución congelada fue liofilizada durante 48 horas y después rehidratada en etanol en concentraciones descendentes (100-90-80%), manteniéndose durante una hora en cada una de ellas.

De esta forma se obtuvo un cilindro de consistencia esponjosa que se cortó en láminas de 2 mm de sección cada una. Dichas láminas fueron esterilizadas durante 8 horas en una solución de etanol al 70%. Finalmente, el scaffold obtenido se neutralizó en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Este medio de cultivo es una variación del EMEM o Eagle's minimal essential medium, usado para cultivos tisulares, y que está compuesto por aminoácidos y vitaminas en una proporción cuatro veces superior al EMEM, glucosa en una proporción del doble del EMEM y sales, entre las que encontramos cloruro cálcico, cloruro potásico, sulfato magnésico, cloruro sódico y fosfato monosódico. Adicionalmente, puede contener hierro y rojo fenol.

Antes de proceder al sembrado de las células, el exceso de fluido fue eliminado y las láminas de scaffold fueron colocadas en placas de cultivo, una en cada pocillo.

Tras este paso, las muestras se secaron utilizando la técnica del punto crítico de CO₂ con el aparato *Baltec CDP 030 critical point dryer*. Después se rociaron con una película de oro y visualizaron utilizando el microscopio electrónico de barrido modelo *JEOL JSM 6100*.

3.3 DISEÑO Y ELABORACIÓN DE LA “CAMISA” DE SOPORTE DEL SCAFFOLD

3.3.1 SELECCIÓN DEL MATERIAL

Se fundamentó en tres criterios:

- Radiolucidez
- Biocompatibilidad
- Bajo precio

Tras la aplicación de estos criterios se optó por la utilización de *FullCure720*, tras la evaluación bibliográfica de las siguientes características:

- **Test de irritación cutánea:**

Prueba la existencia de signos de irritación tras la exposición a los modelos impresos. El test se realiza en **animales de laboratorio**.

- **Test de sensibilización:**

Prueba el potencial alergénico mediante la exposición a los modelos impresos. El test se realiza inyectando el material en animales de laboratorio.

- **Test de citotoxicidad:**

Prueba el número de células muertas tras la exposición a los modelos impresos. El test se realiza en cultivos celulares en agar.

- **Conformidad con los criterios de clase IV de la *United States Pharmacopeia (USP)*:**

Se realiza inyectando extractos de material diluido en ratones y conejos. Los criterios clase IV incluyen la realización de las pruebas clase V más un test de implantación.

La USP describe la clasificación de los materiales plásticos en seis clases, basados en respuestas a una serie de tests in vivo para los cuales están descritos tanto los extractos necesarios como los materiales y las rutas de administración. La clase IV requiere el test más exigente de las seis clases. Los extractos del material de prueba son preparados en suero salino, alcohol + suero salino, polyethylene glicol (PEG 400) y aceite vegetal. Los extractos y controles son inyectados en ratones y conejos, los cuales son observados varias veces durante un período de 72 horas. La respuesta de estos animales es comparada con los sujetos control. Estas pruebas constituyen el Test de respuesta sistémica y el Test intracutáneo. Los materiales que pasen estas dos pruebas cumplen con la Clase V USP.

La Clase IV incluye además un Test de implantación mediante el cual tiras del material a estudio, así como de un material control, son implantadas en conejos por un período no inferior a 120 horas. Se observa la aparición o no de hemorragia,

necrosis, decoloración o infecciones y se valora el grado de encapsulamiento, comparando con el control.

El material *FullCure* es un fotopolímero acrílico de aspecto transparente que no requiere ningún post procesamiento y los modelos se pueden tocar inmediatamente después de la construcción.

3.3.2 DISEÑO DE LA FORMA DE LA “CAMISA”

Para realizar el diseño morfológico de la camisa de transporte se realizó un escaneado de las mandíbulas de cadáver de oveja. Para ello se utilizó la tecnología CAD 3D, (*Computer-aided manufacturing*) manejada por la empresa *Prodintec*.

De manera digital se efectuarán osteotomías “virtuales” en el cuerpo mandibular de las mismas que definirían mandibulectomías segmentarias reproducibles de 30 mm de diámetro mayor.



Figura 3: Imagen de las mandíbulas proporcionadas, con las zonas señaladas correspondientes a la osteotomía virtual.

Con el modelo tridimensional de estos defectos, se elaboró la camisa de *FullCure720* con múltiples fenestraciones que permitirán una neovascularización del territorio a regenerar y una solapa de ubicación lingual que aislará el material osteoprodutor transferido de la cavidad oral de la oveja.

3.4 DISEÑO MORFOLÓGICO DEL SCAFFOLD

Con la finalidad de poder construir un scaffold volumétricamente adaptable a los defectos mandibulares generados en las mandíbulas de oveja, se procedió, a partir de los defectos digitales obtenidos a partir de las mandíbulas cadavéricas, a la fabricación de un modelo de silicona que sirvieran de molde reutilizable para la elaboración de “scaffolds” con dimensiones estándar.

3.5 APLICACIÓN DEL “CONSTRUCTO” EN ANIMAL VIVO

Bajo anestesia general con e intubación orotraqueal y, siguiendo el protocolo del Servicio Veterinario del Bioterio de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de Oviedo, se realizó un defecto segmentario de 30 mm de longitud en el cuerpo mandibular de una oveja de 64 kg de peso.

Ulteriormente se procedió a la aplicación de la camisa elaborada prequirúrgicamente y a la introducción del “scaffold” obtenido a partir de su propio suero. Para el mantenimiento ortopédico del espacio engendrado se emplearon placas de reconstrucción mandibular (Modus, Tarma 2.5) con tres tornillos bicorticales a ambos

lados de las osteotomías.

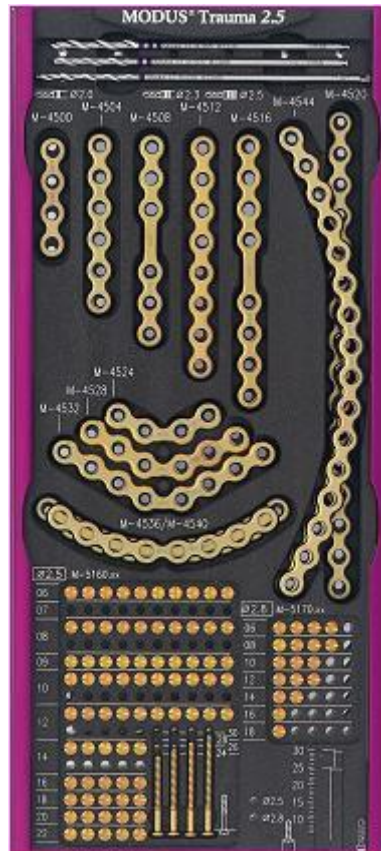


Figura 4: Caja de placas de reconstrucción empleadas en el estudio

4. RESULTADOS

4.1 ELABORACIÓN Y ANÁLISIS DEL SCAFFOLD

Macroscópicamente el scaffold elaborado presentaba una coloración marronácea y una consistencia semirrígida, que permitía una fácil manipulación pero no posibilitaba una resistencia suficientemente apropiada para su fijación mediante tornillos.

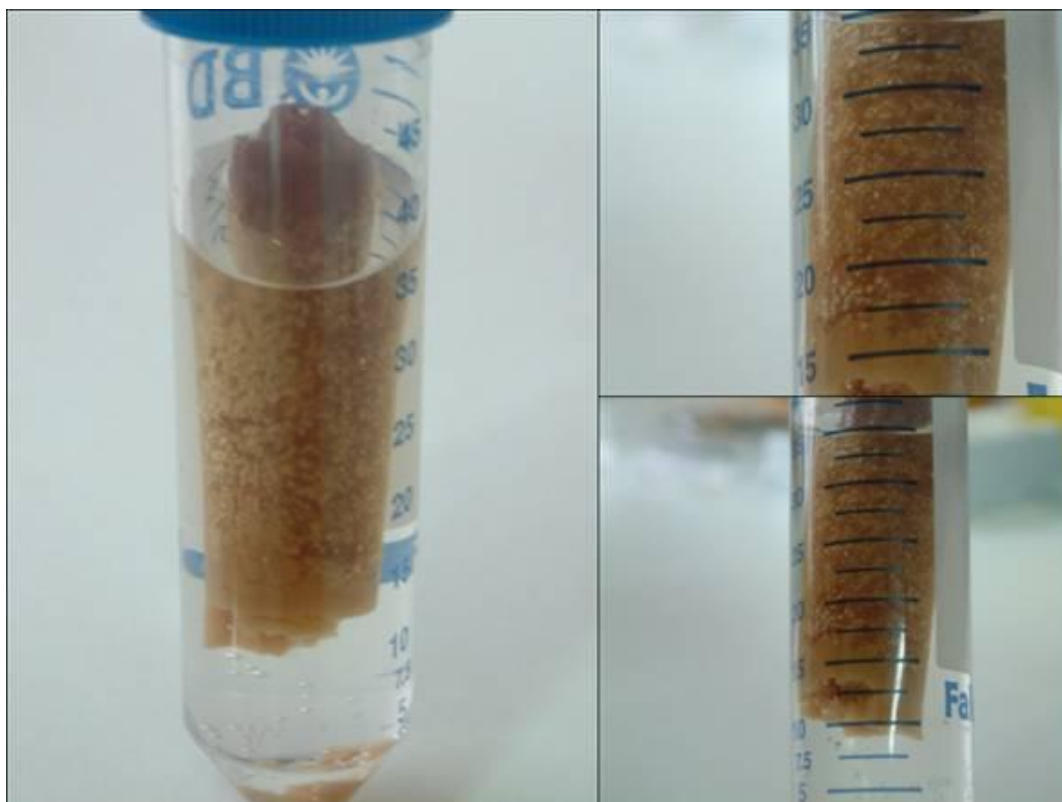


Figura 5: Aspecto macroscópico del scaffold elaborado a partir de la sangre de la oveja

El scaffold al ser analizado con Microscopía óptica de barrido demostró la presencia de múltiples poros con un tamaño que oscilaba entre 100 y las 300 μm . Los mentados poros, con diferentes irregularidades mostraban la presencia de numerosos puentes que los interconectaban.

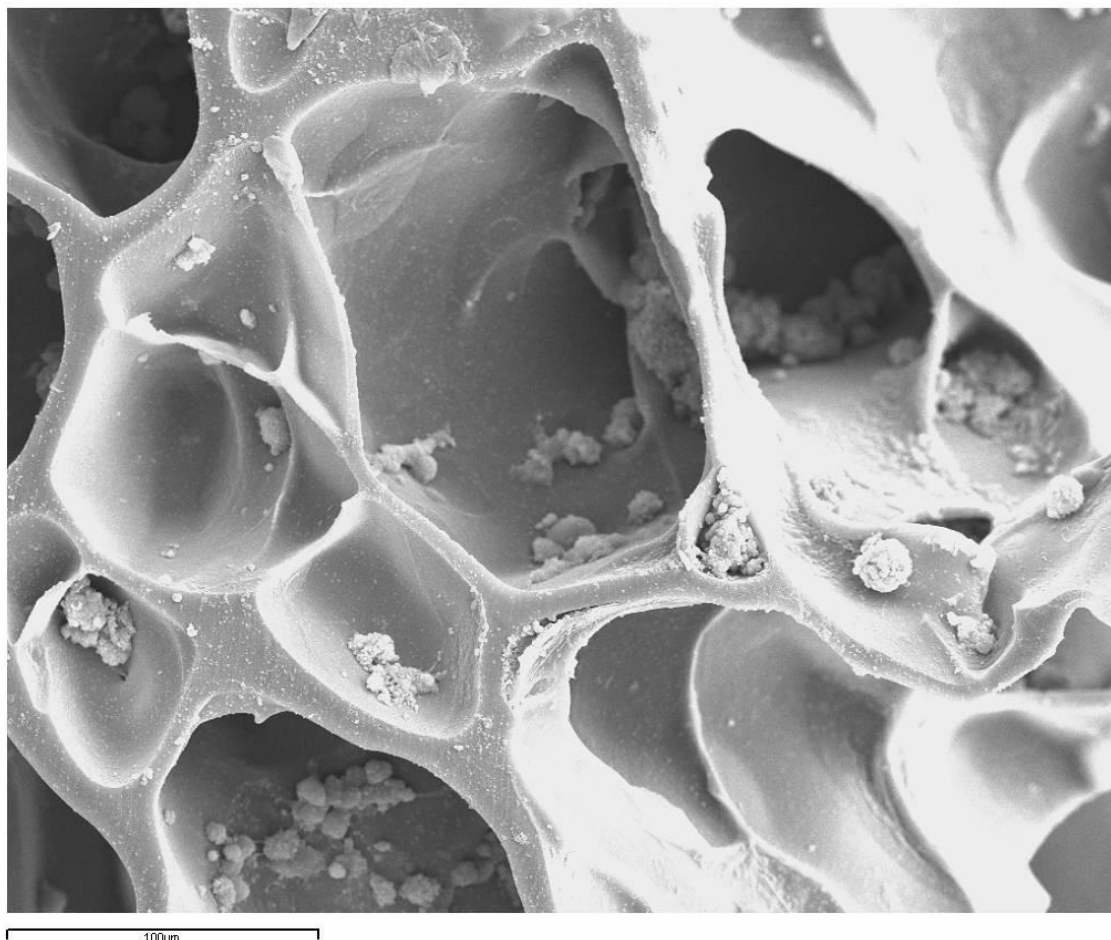


Figura 6: Imagen a escaso aumento de microscopía electrónica de barrido en la que se puede apreciar la porosidad de la matriz (x300).

4.2 DISEÑO Y ELABORACIÓN DE LA “CAMISA” DE SOPORTE DEL SCAFFOLD

Para la obtención de los modelos tridimensionales del defecto y tras el escaneado de las mandíbulas de oveja se procedió a la definición en el ordenador de dos líneas imaginarias de corte separadas entre si por 30 mm y ubicadas en el cuerpo mandibular, por delante del agujero mentoniano. Utilizando la tecnología CAD/CAM se generó una

base de datos con las características geométricas del defecto (CAD). Gracias a esta tecnología de diseño se mejoró sensiblemente las posibilidades de las técnicas convencionales al poder visualizar en pantalla el prototipo en tres dimensiones, rotarlo, colorearlo, obtener secciones y modificarlo con rapidez.



Figura 7: Reproducción tridimensional del tamaño del defecto.

Sobre este modelo tridimensional del defecto se diseñó y aplicó el primer prototipo de “camisa” de transporte que abrazaría, a manera de una bandeja, la porción basal del scaffold.

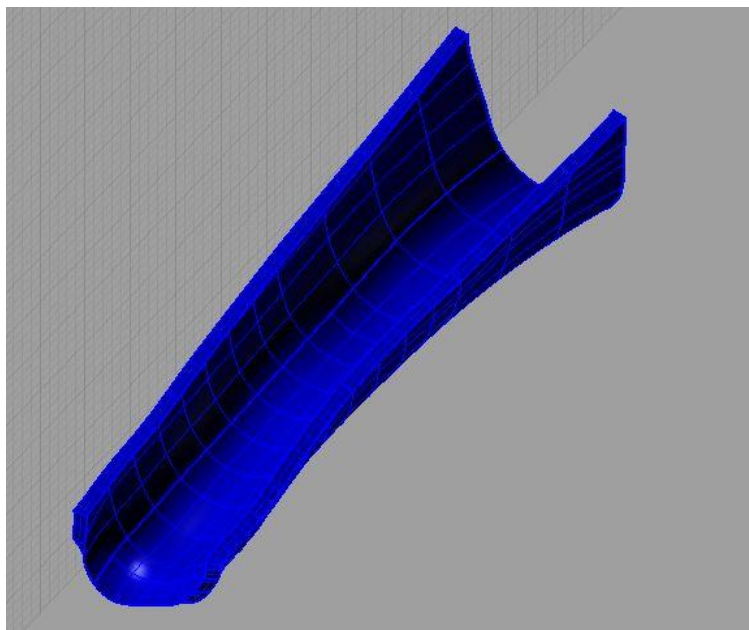


Figura 8: Primer prototipo experimental de la “camisa” de soporte

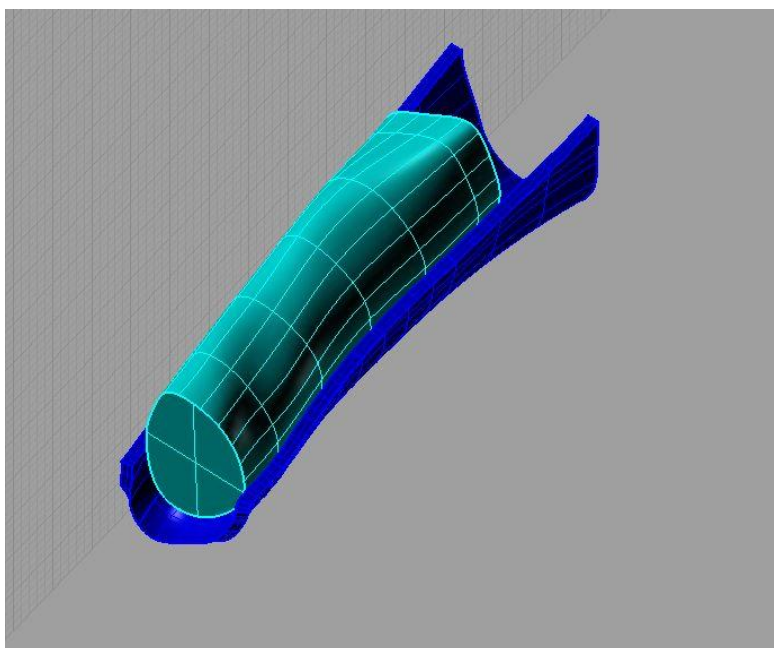


Figura 9: Modelo que reproduce la “camisa” diseñada soportando el supuesto scaffold.

Por otra parte aplicando las técnicas de ingeniería asistida por ordenador, se efectuaron simulaciones del material empleado como “bandeja” para el scaffold sometiendo la pieza diseñada a fuerzas de compresión y tracción.

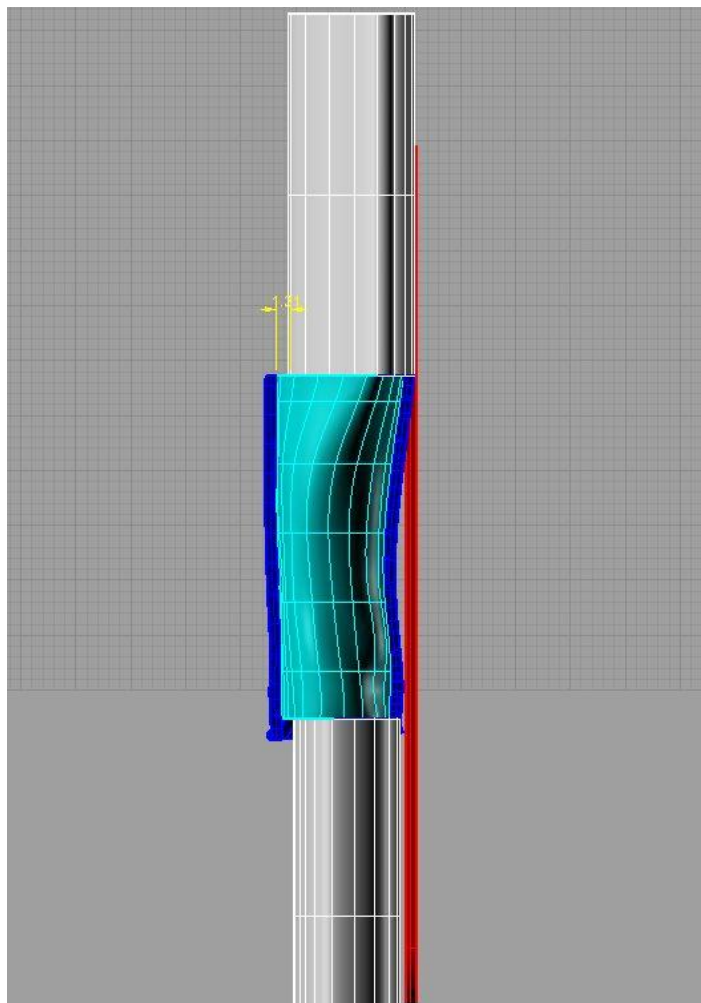


Figura 10: Análisis biomecánico del material y morfología de la “camisa” de soporte

Con la información precedente objetivamos como limitación del primer prototipo la inexistencia de un área geométrica de adaptación para la placa de estabilización del material y la colocación de los tornillos de osteosíntesis, por lo que se procedió a la elaboración de un segundo prototipo que contemplara estos aspectos.

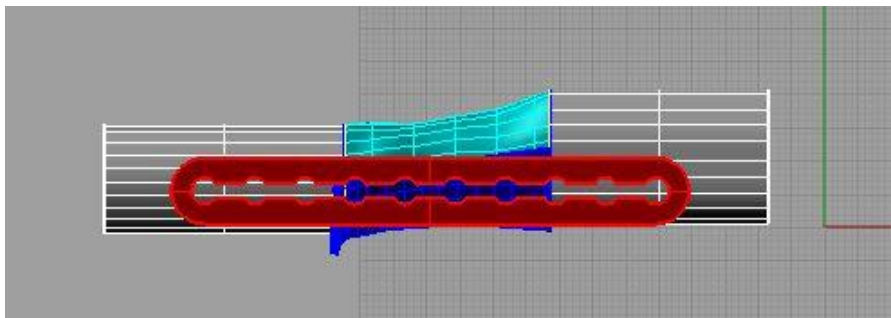


Figura 11: Representación del prototipo final con la inclusión de la placa de reconstrucción.

A partir del diseño CAD del prototipo previamente detallado se crearon los dispositivos de control numérico que controlarían la producción mediante el sistema CAM del prototipo *FullCure720* con fenestraciones (a modo de malla) que facilitarían el aporte vascular del material a injertar.

4.3 DISEÑO MORFOLÓGICO DEL SCAFFOLD

Para este objetivo se confeccionó un molde sólido de silicona en cuyo interior se reproducía con total exactitud las dimensiones del scaffold, de tal manera que pudiera fabricarse de manera reproducible cuantas veces lo necesitáramos.



Figura 12: Moldes de silicona para la reproducción morfológica del scaffold. Izquierda de calota. Derecha defecto mandibular de oveja.

4.4 APLICACIÓN DEL “CONSTRUCTO” EN ANIMAL VIVO

Bajo anestesia general e intubación orotraqueal se realizó una incisión submandibular derecha a una oveja considerada como estandar racial no definido de 64 Kg de peso. Se efectuó una mandibulectomía segmentaria de 30 mm en el cuerpo

mandibular, previa colocación de una placa de reconstrucción de 2,5 adaptada a la morfología natural de la mandíbula del animal. Se seccionó el nervio mentoniano. El “constructo” fabricado constituido por la “camisa” y el scaffold (sin células) se llevó al defecto quirúrgico comprobando su perfecta adaptación y estabilidad. La oveja intervenida permanece viva y sin complicaciones a los dos meses de la cirugía, mantenida en régimen extensivo, maximizando los tiempos de pastoreo en habitat natural.

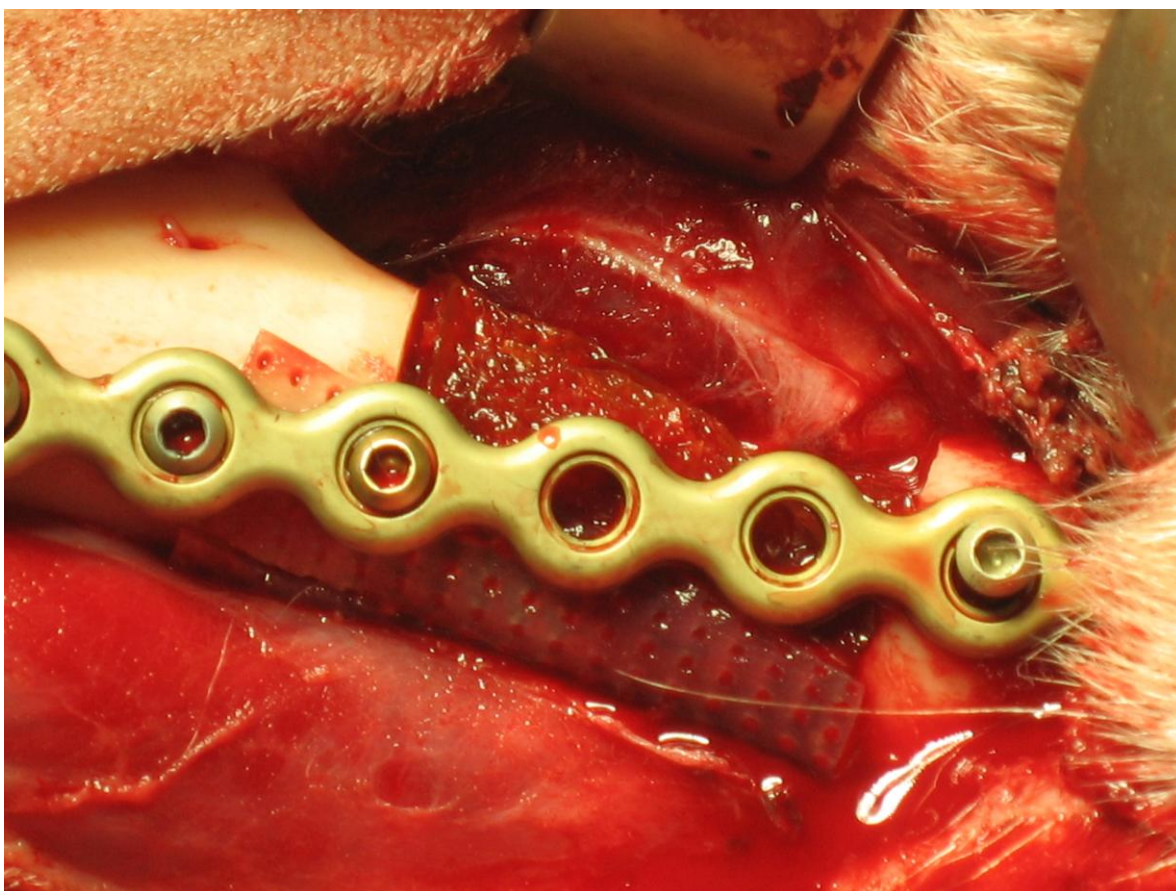


Figura 13: Aplicación “in vivo” del constructo en el defecto mandibular de la oveja.

5. DISCUSIÓN

5.1 ELABORACIÓN, MORFOLOGÍA Y ANÁLISIS DEL SCAFFOLD

Cualquier tejido vivo está compuesto de matriz extracelular y una o varias líneas celulares. La matriz representa un soporte tridimensional para las células que aloja, además de una reserva de agua, nutrientes y factores de crecimiento. En este sentido, la ingeniería tisular ha de proveer a las células cultivadas de un medio que actúe de la misma forma, con el fin de permitir el crecimiento y diferenciación celular, desarrollo de hueso nuevo y neovascularización del mismo (Salgado et al., 2004; Wiesmann et al., 2004).

Las diferentes matrices deben poseer unas cualidades macroscópicas, microscópicas y físicas que posibiliten el desarrollo de sus funciones:

-Biocompatibilidad:

No deben generar respuesta inmune.

-Porosidad:

Gran porosidad y alta interconexión entre los poros, que posibilite la acumulación y correcta distribución de los osteoblastos y mejore su neovascularización. Esta propiedad es particularmente importante en el cultivo de hueso, cuyo elevado gasto metabólico, obliga a asegurar una correcta nutrición, aporte de gases y excrección de residuos.

-Tamaño de poro:

El tamaño ideal se estima entre los 150-900 μ m, aunque existen trabajos que abogan por el uso de matrices con macroporos.

-Superficie:

Hace alusión a las propiedades químicas, como la adhesión celular, y a las propiedades topográficas, siendo especialmente relevante la osteoconducción. Es

importante que el clot de fibrina que se instala en el scaffold previo a la migración celular, no provoque su retracción y, para ello, han resultado más apropiadas las superficies rugosas que las lisas o suaves.

-Osteoinducción:

Esta cualidad, ya descrita, resulta deseable sobre todo para reparar defectos óseos amplios.

-Propiedades mecánicas y biodegradabilidad:

Deben de tener la consistencia adecuada para soportar las presiones tanto in vitro como in vivo y la capacidad de reabsorción debe ir lo más pareja posible a la formación de hueso nuevo.

De la arquitectura del scaffold o matriz tridimensional depende el resultado final, en la forma, del nuevo hueso creado (Abukawa et al., 2006). En los últimos años, diferentes materiales han sido objeto de investigación en ingeniería tisular, como las hidroxiapatitas, poliésteres y diferentes polímeros de origen natural como el colágeno, chitin y quitosan (derivados de crustáceos).

Los polímeros sintéticos más frecuentemente estudiados en ingeniería tisular del territorio cráneo-maxilofacial son los poliésteres, ácido poliglicólico (APG), ácido poliláctico (APL) y policaprolactona. Por otra parte, también han sido estudiados polímeros de origen natural, como el colágeno, ácido hialurónico, alginato, agarosa o quitosan (Abukawa et al., 2006).

El llamado PLGA (ácido poliglicólico-poliláctico) es un copolímero sintético de APG y APL, al igual que, por ejemplo, la sutura reabsorbible de nombre comercial Vicryl

(Ethicon, Somerville, New Jersey). Abukawa et al. (2003) lo utilizaron por primera vez como scaffold tridimensional para restituir un cóndilo mandibular porcino, sembrándolo con células madre mesenquimales autólogas.

Arpornmaeklong et al. (2007) realizaron un estudio comparativo entre diferentes matrices basadas en el quitosan combinadas o no con colágeno. Las células empleadas en este caso fueron células madre mesenquimales de ratón. La porosidad de las matrices constituyó en este original artículo un interesante apartado, al observar que el colágeno incorporado al quitosan aumentaba el tamaño del poro y la homogeneidad del mismo, lo que posibilitó un mejor crecimiento y diferenciación osteoblástica, aún tratándose de tamaños de poro pequeños (64–85 μm). Hay que tener en consideración que el tamaño medio de un osteoblasto es de 10-30 μm y por tanto necesita dimensiones del poro mayores para establecer un contacto intercelular, crecer y producir matriz ósea.

Los diversos tipos de matrices se pueden resumir en las categorías siguientes:

-Cerámicas:

Ampliamente utilizadas en ingeniería ósea y pueden ser de origen natural, como la hidroxiapatita coralina, o bien sintéticas, como la hidroxiapatita sintética o fosfato tri cálcico. Poseen una reconocida capacidad osteoconductora y han demostrado buenos resultados de forma aislada o con cultivos celulares, pero presentan inconvenientes, fruto de su inestabilidad mecánica y de la falta de predictibilidad en su reabsorción, escasa para la mayoría de las cerámicas. Por otra parte, pueden incrementar las concentraciones de calcio y fósforo extracelular de forma importante, hasta el grado de producir la muerte celular (Meyer et al. 2005; Salgado et al., 2004).

-Polímeros reabsorbibles:

Considerados como el scaffold ideal y pueden dividirse en naturales o sintéticos.

-Naturales: de origen vegetal o animal, entre ellos se encuentran el colágeno, fibrinógeno, chitosán, ácido hialurónico y polihidroxitirato. Sus ventajas son: escaso potencial inmunogénico, propiedades bioactivas, versatilidad química y capacidad de interacción con el huésped.

-Sintéticos: Usados de forma habitual, entre ellos se encuentran los polihidroxiácidos, policaprolactone, polipropileno, policarbonatos, polifosfazoles y polianhídridos.

Table 3. Natural and synthetic polymers used for bone tissue engineering applications.

<i>Material</i>	<i>Origin</i>	<i>Characteristics</i>
Collagen	Natural	Low immune response Good substrate for cell adhesion Chemotactic Scaffolds with low mechanical properties
Fibrin	Natural	Promotes cell migration and vascularization Promotes Osteoconduction Usually is used as a cell carrier for cell seeding on scaffolds
Chitosan	Natural	Hemostatic Promotes osteoconduction and wound healing
Starch	Natural	Thermoplastic behavior Good substrates for cell adhesion Non-cytotoxic and biocompatible Bone bonding behavior when reinforced with hydroxylapatite Scaffolds based on these materials have good mechanical properties
Hyaluronic acid (HA)	Natural	Minimal immunogenicity Chemotactic when combined with appropriate agents Scaffolds with low mechanical properties
Poly(hydroxybutyrate)	Natural	Natural occurring β -hydroxyacid Adequate substrate for bone growth Usefulness is limited due to brittle nature
Poly(α -hydroxy acids)	Synthetic	Extensively studied aliphatic polyesters Degradation by hydrolysis Already approved for other health related applications Acidic by products (e.g. lactic acid, glycolic acid), that enter the tricarboxylic acid cycle or in alternative (e.g. glycolic acid) are excreted in the urine It can present problems regarding biocompatibility and cytotoxicity in the surrounding area of the implantation site
Poly(ϵ -caprolactone)	Synthetic	Aliphatic polyester Degraded by hydrolysis or bulk erosion Slow degrading Degradation products incorporated in the tricarboxylic acid cycle Low chemical versatility Some problems related with withstanding mechanical loads
Poly(propylene fumarates)	Synthetic	Unsaturated polyester consisting on alternating propylene glycol and fumaric acids. Main degradation products are fumaric acid and propylene glycol Satisfactory biological results
Poly(BPA iminocarbonates)	Synthetic	Good biocompatibility when implanted in a bone canine chamber model
Poly(phosphazenes)	Synthetic	Contain alternating nitrogen and phosphorous with no carbon atoms in the backbone structure Degradation through hydrolysis
Poly(anhydrides)	Synthetic	Mainly developed as drug delivery carriers Biocompatible Support both endosteal and cortical bone regeneration

Figura 15: Principales características de los distintos tipos de matrices (Salgado et al., 2004)

El scaffold proteico desarrollado, y evaluado en el presente trabajo tiene un tamaño de poro que oscila entre los 100-300 μm , según pudimos detallar en su análisis con microscopía electrónica de barrido, que sin duda permitiría el crecimiento osteoblástico y la producción de matriz mineralizada, tanto in vitro como in vivo. Cabría suponer que este tamaño de poro estaría rondando el límite apropiado para permitir la neovascularización

Por otra parte existen otras características poco discutidas en la literatura, pero no por ello menos trascendentes, como son la facilidad de obtención de la matriz tridimensional y su mayor o menor coste. En el caso de la matriz desarrollada y evaluada en el presente trabajo, una pequeña muestra de plasma de la oveja nos permite obtener la fibrina y un compuesto tan común como el glutaraldehído, mezcla aprobada por la FDA para otro tipo de formulaciones testadas en humanos, constituyen los elementos esenciales y suficientes para desarrollar el scaffold, con los pasos pertinentes de congelación y liofilización.

A la hora de proceder a su diseño morfológico el presente estudio pone en evidencia que con la elaboración de un simple modelo de silicona es posible reproducir de forma rápida y económica el tamaño del defecto de manera que resulte mas sencilla su aplicación clínica.

La formación ósea también está modulada por la acción de citoquinas y diversos factores de crecimiento, que estimulan tanto a las células añadidas al scaffold de forma artificial como a las células del propio individuo para favorecer su migración y posterior diferenciación a células con capacidad osteogénica. Los factores de crecimiento son

elaborados y secretados de modo natural por las células del cultivo y del propio individuo, pero en los últimos tiempos, la ingeniería tisular ha estudiado la idea de que estos factores pueden ser aportados de forma exógena, favoreciendo una mejor y más rápida osteoformación (Meyer et al., 2004; Jiang et al., 2006).

Uno de los factores más investigados son las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Fue en 1980 cuando Urist divulgó la identificación en la matriz orgánica de una proteína insoluble de bajo peso molecular a la que denominó “bone morphogenetic protein”. Poco tiempo después otros autores aislarían del hueso bovino diferentes polipéptidos de 16-18 y 30KDa de peso molecular, que pasaron a denominarse BMPs 1-3.6 (Wang et al., 1988).

Inicialmente, uno de los grandes problemas que estos métodos de aislamiento presentaban se centraba en que para obtener 1mg de BMP pura se precisaban más de 1kg de hueso bovino. Un hecho capital fue la identificación del gen correspondiente a la BMP-2, lo que permitió mediante técnicas de biología molecular e ingeniería tisular la obtención de células capaces de sintetizar grandes cantidades de BMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) con la misma capacidad osteoinductiva que la forma natural.

Por otra parte ya en 1996 Boyne y sus colaboradores demostraron la capacidad de la rhBMP-2 para reparar soluciones de continuidad mandibulares y hendiduras palatinas en diferentes tipos de monos. Recientemente han publicado los resultados de su empleo en reconstrucciones mandibulares en humanos (Herford y Boyne, 2008).

5.2 DISEÑO Y ELABORACIÓN DE LA “CAMISA” DE SOPORTE DEL SCAFFOLD

El diseño y elaboración de la “camisa” de soporte se realiza apoyándose en la tecnología CAD-CAM, abreviatura inglesa para las siguientes expresiones:

-Diseño asistido por ordenador (Computer-Aided Design)

-Fabricación asistida por ordenador (Computer-Aided Manufacturing)

Introduciendo en el sistema características del producto a generar como pueden ser el tamaño, el contorno y la forma de cada componente, almacenados como figuras bi y tridimensionales, el diseñador puede modificarlos e incluso compartir e integrar las ideas combinadas de varios diseñadores, ya que es posible mover los datos dentro de redes informáticas, haciendo así posible el trabajo conjunto de varias personas a distancia.

Los sistemas CAD también permiten simular la funcionalidad de un producto, incluso en términos de soporte de cargas, conducción eléctrica o manejo de fluidos.

Cuando los sistemas CAD se conectan a equipos de fabricación también controlados por ordenador conforman un sistema integrado CAD/CAM. La fabricación asistida por ordenador ofrece significativas ventajas con respecto a los métodos más tradicionales de control de equipos de fabricación. Por lo general, los equipos CAM conllevan la eliminación de los errores del operador y la reducción de los costes de mano de obra. Además, la precisión constante y el uso óptimo previsto del equipo representan ventajas aún mayores.

Los equipos CAM se basan en una serie de códigos numéricos, almacenados en archivos informáticos, para controlar las tareas de fabricación. Este Control Numérico por Computadora (CNC) se obtiene describiendo las operaciones de la máquina en términos de los códigos especiales y de la geometría de formas de los componentes, creando archivos informáticos especializados o programas de piezas. La creación de estos programas de piezas es una tarea que, en gran medida, se realiza hoy día por software informático especial que crea el vínculo entre los sistemas CAD y CAM.

El área de prototipos rápidos es una evolución de las técnicas de CAD/CAM, en la que las imágenes informatizadas tridimensionales se convierten en modelos reales empleando equipos de fabricación especializados, como por ejemplo un sistema de estereolitografía.

En el caso que nos atañe se utiliza el sistema de impresión Objet 3D®, basado en la tecnología Polyjet®, que materializa las formas mediante la colocación sucesiva de secciones de un polímero acrílico líquido, que se polimeriza por radiación UV segundos después de ser depositado.

El polímero utilizado en este sistema de impresión se conoce con el nombre comercial de FullCure 720. El material FullCure es un material fotopolímero y acrílico de aspecto transparente que permite construir una amplia gama de modelos rígidos que permiten observar el flujo de líquidos y detalles internos. No requiere ningún post procesamiento ya que los materiales están completamente tratados. Presenta un estiramiento hasta un 20% habilitado para algunas operaciones funcionales, así como una alta resistencia de impacto. Los modelos se pueden tocar inmediatamente después de la

construcción y el material parecido a un gel es fácil de extraer y produce modelos de acabado liso, por lo cual las superficies de los modelos absorben pintura fácilmente, sin necesidad de procesados adicionales. El material de los modelos puede ser atornillado, cromado o usado como un molde.

5.3 APLICACIÓN DEL “CONSTRUCTO” EN ANIMAL VIVO

Una vez elaborado el “constructo”, este se implanta en la oveja, que es el animal utilizado en esta investigación. La elección de la oveja como sujeto experimental no es una elección aleatoria, si no basada en un riguroso análisis de la literatura publicada hasta la fecha.

La práctica de la experimentación en animales tiene una vigencia de varios siglos. Ya en el siglo II d.C., el médico romano Galeno experimentaba con cerdos y monos para demostrar que las venas transportaban sangre, no aire, como hasta entonces se creía.

A principios del siglo XVII el médico inglés William Harvey estudió diversos animales, como gusanos, insectos, peces y ranas, y proporcionó novedosas apreciaciones sobre el principio que explica la circulación de la sangre por el cuerpo. La utilización de animales para la experimentación aumentó de modo significativo en el siglo XIX, lo que refleja el rápido desarrollo de la ciencia durante ese siglo.

Las ratas, los ratones y las aves son los animales más utilizados en experimentación por su fácil manipulación debido a su pequeño tamaño así como a la

facilidad para la reproducción por su corto período de gestación y la generación de amplias camadas en la descendencia.

En el período comprendido entre 1990 y 2011, las ovejas fueron utilizadas en entre un 9 y un 12% de los estudios de investigación en ortopedia, incluyendo aquellos acerca de fracturas, osteoporosis, alargamiento óseo y osteoartritis, en comparación con el poco más del 5% que se registró en el período entre 1980 y 1980. Este incremento en la utilización de la oveja como animal de experimentación puede estar relacionado con los asuntos éticos y la percepción negativa que sobre el público ejerce el uso de animales de compañía, como el perro, para la investigación biomédica.

La oveja es significativamente mayor que otros animales de laboratorio. Desde la propia gestación, sus fetos son mayores que la mayoría de los animales comunes de uso en laboratorio, permitiendo esto su fácil manipulación incluso para la realización de cirugías intrauterino.

Las ovejas adultas son fáciles y económicas de mantener y pueden ser criadas en numerosos ambientes. Toleran bien la anestesia inhalada y, con medidas de control adecuadas, pueden mantenerse libres de enfermedades. Su largo período de cría unido a su período de gestación de 150 días, permiten que la oveja pueda criar de nuevo tras una intervención quirúrgica.

Algunas desventajas deben también tenerse en cuenta cuando se plantea usar la oveja como animal de experimentación. El hecho de que estén cubiertas de lana puede ser un inconveniente para el procesado de determinadas pruebas experimentales.

También hay que tener en cuenta el hecho de que es un animal rumiante, sobre todo antes del uso de anestesia general, para prevenir regurgitaciones y problemas intestinales.

Independientemente del tipo de investigación, existen una serie de premisas básicas que debe cumplir un animal para ser incluido dentro de un protocolo experimental y entre las que debemos señalar:

- Que sea idóneo para el proceso que se pretende reproducir.**
- Que se encuentre disponible para todos los investigadores.**
- Que tenga tamaño suficiente para obtener muestras necesarias.**
- Que se pueda mantener en instalaciones habituales y poco complejas.**
- Bajo costo de mantenimiento.**

La oveja es un animal abundante en todos los países, se maneja fácilmente, incluso por personal no especializado, no requiere cuidados especiales y, en muchas ocasiones, con una alimentación a base de concentrado y forraje es posible mantenerla. Además, gracias a su tamaño intermedio, permite que los gastos para la manutención no sean elevados y, en cambio, nos permite obtener una serie de muestras y realizar una serie de manipulaciones que en otras especies no sería posible.

El techo de la cavidad oral en la oveja se encuentra formado por los siguientes huesos:

- Hueso palatino (par)**
- Hueso cigomático (par)**
- Hueso maxilar (par)**

-Hueso incisivo (par)**-Hueso vómer (único)**

El hueso maxilar forma la base ósea de la mayor parte de la cara, moldea las paredes faciales laterales, las cavidades nasal y oral y el techo del paladar y está comunicado con todos los restantes huesos de la cara.

El cuerpo del maxilar en la oveja, por ser un rumiante, se encuentra neummatizado, así como también está neummatizada la apófisis palatina, formando el seno palatino.

Cabe destacar la anatomía de la apófisis alveolar del hueso maxilar que, en su borde libre, forma los alvéolos dentales, que están separados por tabiques interalveolares para los molares. Las raíces de los dientes protruyen hacia el exterior como protuberancias alveolares. Los ruminantes carecen de caninos en el hueso maxilar.

La apófisis palatina del hueso maxilar se proyecta medialmente como placa horizontal que nace a nivel de la apófisis alveolar y en el plano medio se vincula con la del otro lado formando la sutura palatina. Ambas placas horizontales, junto con el hueso incisivo forman el techo de la cavidad oral.

El hueso incisivo, hueso par, está formado por cuerpo, apófisis nasal y apófisis palatina, careciendo de apófisis alveolar en los ruminantes, con lo cual no presentan dientes a nivel del hueso incisivo.

En cuanto a la anatomía de la mandíbula, esta se divide en cuerpo y rama mandibular. El cuerpo, a su vez, se subdivide en pars incisiva y pars molaris. La pars incisiva forma una placa horizontal con una cara labial convexa y una cara lingual cóncava,

que están unidas en el arco alveolar. En sus alvéolos se encuentran insertados los seis dientes incisivos. En la pars molaris se puede diferenciar una cara bucal y una cara lingual con un borde ventral. En el borde dorsal y caudal al borde alveolar se encuentran los alvéolos para los molares, que en el caso de los rumiantes son seis. Rostralmente sigue el diastema, que es especialmente largo en el caso de la oveja.

El cuerpo de la mandíbula es atravesado por el canal mandibular, que contiene al nervio alveolar mandibular, de carácter sensitivo.

La rama de la mandíbula se sitúa como un hueso plano en dirección al arco cigomático y en su cara lateral presenta la fosa masetérica y en la medial la fosa pterigoidea.

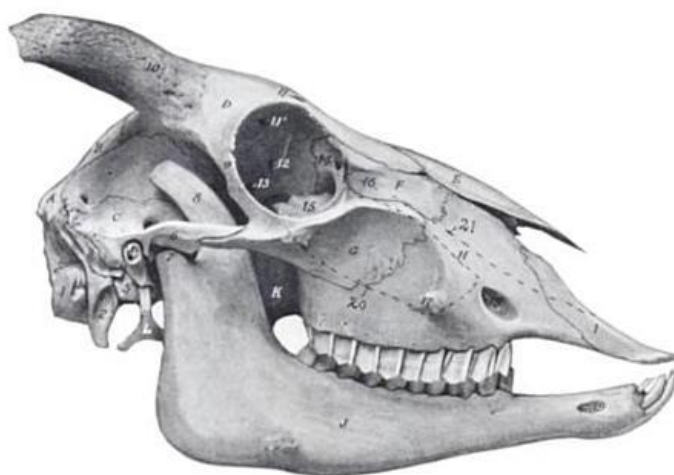


Fig. 26-61. Cráneo de la oveja; vista lateral.

A, hueso occipital; B, hueso parietal; C, parte escamosa del hueso temporal; D, hueso frontal; E, hueso nasal; F, hueso lagrimal; G, hueso cigomático; H, maxilar; I, hueso incisivo; J, mandíbula; K, placa perpendicular del hueso palatino; L, hueso hioides; 1, cóndilo occipital; 2, apófisis yugular; 3, apófisis mastoidea; 4, meato acústico externo; 5, bulla timpánica; 6, apófisis cigomática del hueso temporal; 7, cóndilo de la mandíbula; 8, apófisis coronoides; 9, apófisis supraorbital; 10, apófisis cornual; 11, 11', abertura del canal supraorbital; 12, foramen etmoidal; 13, foramen óptico; 14, fosa para el saco lagrimal; 15, bulla lagrimal; 16, fosa lagrimal externa; 17, tuberosidad facial; 18, foramen infraorbital; 19, foramen mental; 20, contorno del seno maxilar; 21, trayecto del conducto nasolagrimal.

Figura 15: Visión lateral del cráneo de una oveja (Sisson et al., 1933)

Mientras, macroscópicamente, los huesos de la oveja pueden representar al humano de una forma relativamente fiel, histológicamente, la estructura ósea de la oveja es bastante diferente.

La oveja presenta, predominantemente, una estructura ósea primaria (osteonas menores de 100 micras de diámetro, conteniendo al menos dos vasos sanguíneos centrales y con ausencia de línea cementaria , en comparación con el hueso humano, que presenta predominantemente una estructura ósea secundaria.

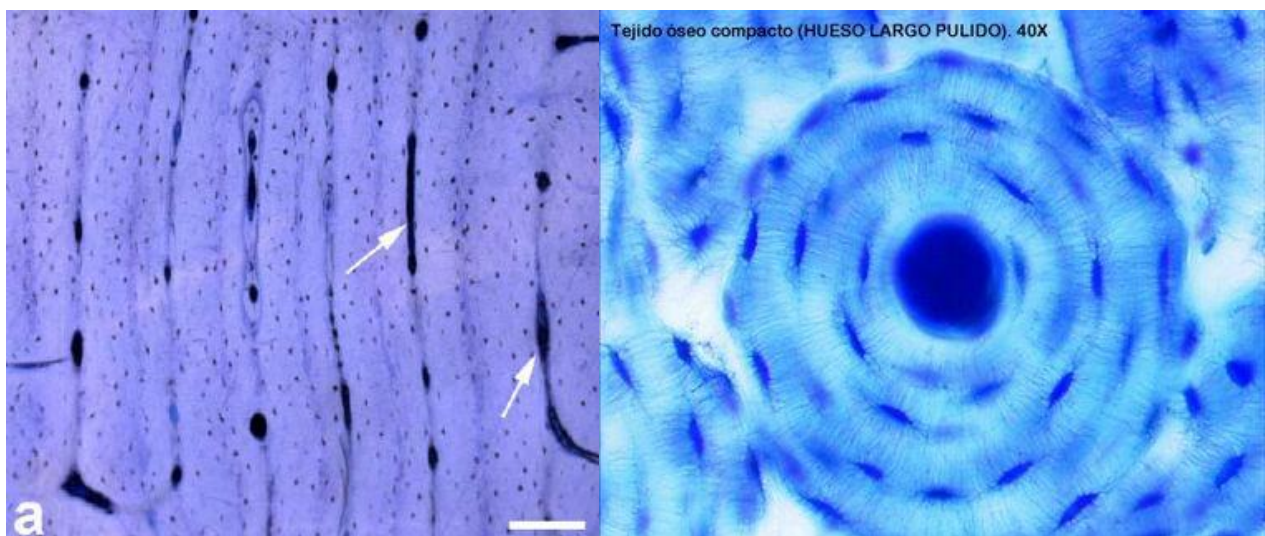


Figura 16: Izquierda: Sección ósea de tibia de oveja, tenida con azul de toluidina, mostrando la apariencia laminar del hueso cortical. Derecha: Sección ósea de hueso humano, usando la misma tinción.

Existen diferencias en la densidad ósea entre el humano y la oveja, dónde la oveja muestra una significativa mayor densidad y, por lo tanto, mayor fuerza.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos obtenidos y con las limitaciones propias del estudio, podemos formular las siguientes conclusiones:

1. La tecnología CAD nos permite reproducir preoperatoriamente defectos segmentarios de la mandíbula de oveja.
2. La tecnología CAM nos permite la elaboración de prototipos *Full-Cure 720* que pueden emplearse a modo de “camisa” para el soporte de un scaffold proteico elaborado a partir de la sangre de la propia oveja.

En consecuencia nuestros resultados nos permiten admitir en general la hipótesis de trabajo planteada de:

“Es posible la reproducción tridimensional prequirúrgica de un defecto segmentario mandibular de oveja, para la elaboración de estructuras de transporte del material osteoprodutor perfectamente ajustadas al defecto”.

7. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abukawa H, Terai H, Hannouche D, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. Reconstruction of a mandible condyle by tissue engineering. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:94-100.
- Abukawa H, Shin M, Williams WB, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:601-6.
- Abukawa H, Papadaki M, Abulikemu M, Leaf J, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. *Dent Clin North Am* 2006;5:205-16.
- Akita S, Fukui M, Nakagawa H, Fujii T, Akino K. Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. *Wound Repair Regen* 2004;12:252-9.
- Allori AC, Sillon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part II: extracellular matrix. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008 Sep;14(3):275-83.

- Allori AC, Sailon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part III: biomechanical forces. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008 Sep;14(3):285-93.
- Allori AC, Sailon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008 Sep;14(3):259-73.
- Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008; 321:699-702.
- Arpornmaeklong P, Suwatwirote N, Pripatnanont P, Oungbho K. Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan-collagen sponges. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36:328-37.

B

- Becerra J, Andrades JA, Santamaría JA, Cifuentes M, Guerado E. Bone regeneration, cell therapy and tissue engineering. *Med Clin (Barc).* 2001 Jan 13;116(1):23-34.
- Boyne PJ. Animal studies of the application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. *Bone* 1996;19 (Suppl):83S–92S.

- Boyne PJ, Nath R, Nakamura A. Human recombinant BMP-2 in osseous reconstruction of simulated cleft palate defects. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998;36:84-90.
- Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res*. 1999 Oct;(367 Suppl):S68-83.

C

- Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol*. 2003 Mar;22(1):81-91.
- Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Found Symp*. 2003;249:133-43; discussion 143-7, 170-4, 239-41.

D

- Drosse I, Volkmer E, Capanna R, De Biase P, Mutschler W, Schieker M. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury*. 2008 Sep;39 Suppl 2:S9-20.

G

- Getty R, Grossman JD, Sisson S. Anatomía de los animales domésticos. Tomo I. 5ª edición. Editorial Masson. Barcelona, 2001.

H

- Handschel J, Wiesmann HP, Depprich R, Kübler NR, Meyer U. Cell-based bone reconstruction therapies--cell sources. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006 Nov-Dec;21(6):890-8.
- Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Apr;66(4):616-24.

J

- Jiang X, Gittens SA, Chang Q, Zhang X, Chen C, Zhang Z. The use of tissue-engineered bone with human bone morphogenetic protein-4-modified bone-marrow stromal cells in repairing mandibular defects in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Dec;35(12):1133-9.

K

- Kanczler JM, Ginty PJ, Barry JJ, Clarke NM, Howdle SM, Shakesheff KM, Oreffo RO. The effect of mesenchymal populations and vascular endothelial growth factor

delivered from biodegradable polymer scaffolds on bone formation. *Biomaterials*. 2008 Apr;29(12):1892-900.

- Kessler S, Koepp HE, Mayr-Wohlfart U, Ignatius A, Claes L, Puhl W, Günther KP. Bone morphogenetic protein 2 accelerates osteointegration and remodelling of solvent-dehydrated bone substitutes. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2004 Jul;124(6):410-4.

M

- Meyer U, Wiesmann HP, Berr K, Kübler NR, Handschel J. Cell-based bone reconstruction therapies-principles of clinical approaches. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006 Nov-Dec;21(6):899-906.

S

- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*. 2004 Aug 9;4(8):743-65.
- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Novel starch-based scaffolds for bone tissue engineering: cytotoxicity, cell culture, and protein expression. *Tissue Eng*. 2004 Mar-Apr;10(3-4):465-74.

- Salgado AJ, Gomes ME, Coutinho OP, Reis RL. Isolation and osteogenic differentiation of bone-marrow progenitor cells for application in tissue engineering. *Methods Mol Biol.* 2004;238:123-30.
- Soucacos PN, Johnson EO, Babis G. An update on recent advances in bone regeneration. *Injury.* 2008 Sep;39 Suppl 2:S1-4.

W

- Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(24):9484-8.
- Wiesmann HP, Joos U, Meyer U. Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Sep;33(6):523-30.

