



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: “RECONSTRUCCIÓN MAXILOFACIAL MEDIANTE
TÉCNICAS DE INGENIERÍA TISULAR Y MICROCIRUGÍA”

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS

TESIS DOCTORAL

**“REPARACIÓN DE DEFECTOS SEGMENTARIOS EN
MANDÍBULAS DE OVEJA MEDIANTE EL EMPLEO DE
CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA CULTIVADAS
IN VITRO SOBRE SOPORTE AUTÓLOGO DE ALBÚMINA
PLASMÁTICA: EVALUACIÓN CLÍNICA, RADIOLÓGICA E
HISTOLÓGICA”**

Dña. Alba Novoa Gómez
Oviedo, Abril de 2018



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: “RECONSTRUCCIÓN MAXILOFACIAL MEDIANTE
TÉCNICAS DE INGENIERÍA TISULAR Y MICROCIURUGÍA”

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS

TESIS DOCTORAL

**“REPARACIÓN DE DEFECTOS SEGMENTARIOS EN
MANDÍBULAS DE OVEJA MEDIANTE EL EMPLEO DE
CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA CULTIVADAS
IN VITRO SOBRE SOPORTE AUTÓLOGO DE ALBÚMINA
PLASMÁTICA: EVALUACIÓN CLÍNICA, RADIOLÓGICA E
HISTOLÓGICA”**

Dña. Alba Novoa Gómez
Oviedo, Abril de 2018

ISBN 978-84-09-00755-4

REPARACIÓN DE DEFECTOS SEGMENTARIOS EN MANDÍBULAS DE OVEJA MEDIANTE EL EMPLEO DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA CULTIVADAS IN VITRO SOBRE SOPORTE AUTÓLOGO DE ALBÚMINA PLASMÁTICA: EVALUACIÓN CLÍNICA, RADIOLÓGICA E HISTOLÓGICA”

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS

Línea de Investigación: Reconstrucción maxilofacial mediante técnicas de ingeniería tisular y microcirugía

Doctorando:

Alba Novoa Gómez

Directores:

Prof. Dr. Luis Manuel Junquera Gutiérrez

Dra. Lorena Gallego López

Oviedo, 2018

ISBN 978-84-09-00755-4



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo



RESUMEN DEL CONTENIDO DE LA TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
REPARACIÓN DE DEFECTOS SEGMENTARIOS EN MANDÍBULAS DE OVEJAS MEDIANTE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA CULTIVADOS IN VITRO SOBRE SOPORTE AUTÓLOGO DE ALBÚMINA PLASMÁTICA: EVALUACIÓN CLÍNICA, RADIOLÓGICA E HISTOLÓGICA	REPAIR OF SEGMENTARY DEFECTS IN SHEEP MANDIBULES BY BONE MARROW MESENQUIMAL CELLS CULTIVATED IN VITRO ON AN AUTOLOGOUS SCAFFOLD OF PLASMA ALBUMIN: CLINICAL, RADIOLOGICAL AND HISTOLOGICAL EVALUATION

2.- Autor	
Nombre: ALBA NOVOA GÓMEZ	DN
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo. Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

Hipótesis de trabajo

1. La reparación ósea de osteotomías segmentarias mandibulares en ovejas puede alcanzarse mediante el empleo de células mesenquimales autólogas de médula ósea cultivadas in vitro.
2. El hueso neoformado con esta metodología presenta similitudes histológicas y radiográficas con el hueso nativo mandibular de la oveja experimental.

Objetivos

1. Desarrollar un equivalente óseo in vitro, mediante el empleo de células mesenquimales de médula ósea de oveja cultivadas en un novedoso soporte tridimensional derivado de la albúmina plasmática del mismo animal.
2. Injertar el producto desarrollado mediante ingeniería tisular en soluciones de continuidad de 30mm creadas mediante mandibulectomías segmentarias en 15 ovejas.
3. Realizar una evaluación clínica, radiológica e histológica de los defectos injertados.

Material y Método

Se utilizaron un total de 15 ovejas hembra de estándar racial no definido, con una edad comprendida entre los 12 y los 15 meses y un peso medio de 59,2 kg. A todos los animales se les practicó un defecto segmentario mandibular de 30mm. Para la reparación de este defecto se utilizó una matriz elaborada a partir de la albúmina plasmática de la sangre del animal, sin células (5 ovejas: grupo control) o la misma matriz cultivada con células mesenquimales diferenciadas obtenidas por punción de la cresta iliaca de los animales (10 ovejas: grupo experimental). Los animales de ambos grupos fueron sacrificados en dos periodos de tiempo: 12 semanas y 32 semanas. La reparación ósea se evaluó mediante histología convencional, tomografía computarizada (*Toshiba Aquilion 16*, *OsiriX—64bit*), micro-CT (*SkyScan 1174*) y microscopía electrónica de barrido (*Qwin Program*). El análisis estadístico fue realizado utilizando el software *SPSS* versión 15.0. Para comparar los valores

obtenidos en el hueso neoformado (N) de cada oveja con el control de hueso "sano" del mismo animal (R), se utilizó la prueba T pareada o la prueba de Wilcoxon. Para comparar los resultados obtenidos a las 32 semanas con los obtenidos a las 12 semanas así como las posibles diferencias entre las ovejas experimentales y las ovejas control, se utilizó la prueba t de Student. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando la $p < 0.05$.

Resultados

En el presente trabajo se ha podido desarrollar un producto con capacidad osteoformadora utilizando células mesenquimales de médula ósea de oveja, diferenciadas sobre una matriz de albúmina derivada del plasma del mismo animal. Este objetivo no se alcanzó utilizando células procedentes de fragmentos óseos de los maxilares de las ovejas. El fenotipo de las células mesenquimales procedentes de las ovejas parece similar al presente en las células mesenquimales de la médula ósea de origen humano. Histológicamente se demostró la formación de hueso en el defecto segmentario, su progresiva mineralización al prolongarse el tiempo de injerto y la reabsorción sincrónica de la matriz investigada. La principal diferencia histológica entre el grupo control y el experimental, reconocible en algunas muestras, era la presencia de áreas de hueso neoformado en íntimo contacto con la matriz proteica y en las partes centrales del defecto.

Radiográficamente la restauración ósea completa del defecto segmentario se alcanzó en 6 ovejas (46,15% del total): dos ovejas del grupo control (sin células) y cuatro ovejas del grupo experimental (con células). La tomografía computarizada evidenció que la reparación completa del defecto segmentario está condicionada por el tiempo de injerto. En el 83,3% de los animales sólo se alcanzó con tiempos de injerto de 32 semanas. En la única oveja en la que se alcanzó una restitución completa a las 12 semanas del injerto el material aplicado llevaba células diferenciadas.

Al comparar el hueso neoformado con el hueso nativo (residente de la oveja) mediante micro-CT se pudo objetivar que era mucho más inmaduro en el grupo control, pero bastante parecido en el grupo experimental, aunque menos mineralizado. Finalmente, en el análisis mediante micro-CT de las diferencias en el hueso neoformado entre las ovejas control y las ovejas experimentales se constató que sólo existían a partir de las 32 semanas de injerto. El hueso de las ovejas experimentales tenía un mayor grado de mineralización, mayor volumen relativo de hueso nuevo, un mayor número de trabéculas, con menor separación y mayor grosor, que el hueso de las ovejas control.

Conclusión

A la luz de nuestros resultados, concluimos que la matriz de albúmina derivada del plasma utilizada como scaffold puede promover la reparación de defectos segmentarios mandibulares en ovejas, pero la combinación con células mesenquimales de médula ósea osteogénicamente diferenciadas acelera este proceso, aumentando significativamente la cantidad y calidad del hueso neoformado.

RESUMEN (en Inglés)**Hypothesis:**

1. Bone repair of segmental mandibular osteotomies in sheep can be achieved through the use of autologous bone marrow mesenchymal cells cultured in vitro.
2. Neoformed bone with this methodology presents histological and radiographic similarities with the native mandibular bone of the experimental sheep.

Aims:

1. To develop a bone equivalent in vitro, using mesenchymal bone marrow cells from sheep cultured in a novel three-dimensional support derived from the same animal's plasma albumin.
2. To graft the product developed by tissue engineering in solutions of continuity of 30mm created by segmental mandibulectomies in 15 sheep.
3. To carry out a clinical, radiological and histological evaluation of the grafted defects.

Material and method

A total of 15 female sheep of an undefined racial standard were used, with an age between 12 and 15 months and an average weight of 59.2 kg. All animals underwent a segmental mandibular defect of 30mm. For the repair of this defect a matrix elaborated from the plasmatic albumin of the blood of the animal was used, without cells (5 sheep: control group) or the same matrix cultivated with differentiated mesenchymal cells obtained by puncture of the iliac crest of the animals (10 sheep: experimental group). The animals of both groups were sacrificed in two periods of time: 12 weeks and 32 weeks. Bone repair was evaluated using conventional histology, computed tomography (Toshiba Aquilion 16, OsiriX-64bit), micro-CT (SkyScan 1174) and scanning electron microscopy (Qwin Program). Statistical analysis was performed using the software SPSS version 15.0. To compare the values obtained in the neoformed bone (N) of each sheep with the control of "healthy" bone of the same animal (R), the paired T-test or the Wilcoxon test were used. To compare the results obtained at 32 weeks with those obtained at 12 weeks as well as the possible differences between the experimental sheep and the control sheep, the Student's t test was used. It was considered that the differences were statistically significant when $p < 0.05$.

Results

In the present work it has been possible to develop a product with osteoforming capacity using mesenchymal cells of bone marrow of sheep, differentiated on a matrix of albumin derived from the plasma of the same animal. This goal was not achieved using cells from bone fragments of the jaws of the sheep. The phenotype of the mesenchymal cells from the sheep appears similar to that present in the mesenchymal cells of the bone marrow of human origin. Histologically, bone formation was demonstrated in the segmental defect, its progressive mineralization as the graft time was prolonged and the synchronous resorption of the matrix investigated. The main histological difference between the control and experimental groups, recognizable in some samples, was the presence of areas of newly formed bone in close contact with the protein matrix and in the central parts of the defect.

Radiographically, complete bone restoration of the segmental defect was achieved in 6 sheep (46.15% of the total): two sheep from the control group (without cells) and four sheep from the experimental group (with cells). The computed tomography showed that the complete repair of the segmental defect is conditioned by the graft time. In 83.3% of the animals it was only achieved with graft times of 32 weeks. In the only sheep in which a complete restitution was reached at 12 weeks after grafting, the applied material carried differentiated cells.

When the neoformed bone was compared with the native bone (resident of the sheep) by means of micro-CT, it could be observed that it was much more immature in the control group, but quite similar in the experimental group, although less mineralized. Finally, in the micro-CT analysis of the differences in the neoformed bone between the control sheep and the experimental sheep, it was found that they only existed after 32

weeks of grafting. The bone of the experimental sheep had a greater degree of mineralization, greater relative volume of new bone, a greater number of trabeculae, with less separation and greater thickness, than the bone of the control sheep.

Conclusion

Despite of our results, we conclude that the albumin matrix derived from plasma used as scaffold can promote the repair of segmental mandibular defects in sheep, but the combination with osseous mesenchymal bone marrow differentiated cells accelerates this process, significantly increasing the amount and bone quality neoformed.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS/
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

AGRADECIMIENTOS

A los directores de esta tesis, los doctores Luisma Junquera y Lorena Gallego, por introducirme en el mundo de la investigación, además de por su apoyo incondicional en el ámbito laboral. Sin sus ideas, su tiempo y su dedicación este trabajo no hubiese sido posible.

Al doctor Luis García-Consuegra por su ayuda con la estadística de este trabajo, una de las partes más complejas, y por su paciencia en las largas tardes de trabajo en el Bioterio.

A todas las personas que han hecho posible esta Tesis Doctoral: Álvaro Meana, Serafín Costilla, José Antonio Vega, Marcos Pérez, María Álvarez, los veterinarios del Bioterio y, en definitiva, todo el personal implicado desde el transporte y manejo de los animales hasta el procesamiento de las muestras y los resultados.

A mi “resi mayor” Joaquim Megías, parte importante también de esta Tesis Doctoral, por las tardes en el Bioterio, el “tráfico” de cabezas de oveja hacia y desde el HUCA, infinitas comunicaciones a congresos sobre el mismo tema... Mucho trabajo pero también muy buenos recuerdos.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital de Cabueñes, los doctores Calvo, Gallego y Pelaz, por sus consejos y su apoyo en esta parte final del proceso de redacción y lectura de la Tesis Doctoral.

Pero, sin duda, el mayor agradecimiento es para mi familia. Mi muleta, mi apoyo incondicional. Esta Tesis Doctoral es la culminación de lo que siempre me han inculcado mis padres: estudio y trabajo para intentar llegar lo más lejos posible. Me habéis hecho el mejor regalo que se le puede hacer a una hija: amor, apoyo y educación. Para mi hermana Marina solo espero ser un ejemplo de que las cosas se pueden lograr con sacrificio y trabajo.

No puedo finalizar los agradecimientos sin recordar a quienes no están. En estos momentos es cuando más os echo de menos. Me hubiese gustado que estuvierais conmigo viendo mi “proyecto” terminado, aunque sé que lo estaréis haciendo desde allí arriba. Sin duda esta Tesis Doctoral está dedicada a mi tío Emilio y a mis abuelos Luis y Elvira, Emilio y Elena. También a mi tío abuelo José Luis, que estará muy orgulloso de su “doctorina”.

“Aunque en el cielo hoy no hay estrellas, yo se muy bien que ahí están”.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 INGENIERÍA TISULAR: CONCEPTO E HISTORIA

1.2 Elementos fundamentales de la ingeniería tisular

1.2.1 Tipos de células utilizadas en ingeniería tisular

1.2.2 Factores de señalización tisular

1.2.3 Matrices de soporte o scaffolds

1.3 Reconstrucción de defectos óseos

1.3.1 Funciones de los injertos óseos

1.3.2 Concepto de defecto segmentario crítico

1.4 Contexto clínico

1.4.1 Opciones reconstructivas en cirugía maxilofacial

1.4.1.1 Injertos libres

1.4.1.2 Colgajos pediculados y microvascularizados

1.4.1.2.1 Colgajos pediculados

1.4.1.2.2 Colgajos microvascularizados

1.4.1.3 Xenoinjertos

1.4.1.4 Injertos óseos sintéticos

2. ESTADO ACTUAL

2.1 Estado actual de la línea de investigación en

Reconstrucción mandibular de nuestro equipo

2.2 La oveja como animal de investigación

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Pregunta de investigación

3.2 Hipótesis de trabajo

3.3 Objetivos

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Diseño experimental

4.2 Animales de experimentación

4.3 Obtención de células mesenquimales de médula ósea y otros procedimientos aplicados para la obtención de células

4.3.1 Punción de la cresta ilíaca bovina

4.3.2 Otros procedimientos de obtención celular

4.3.3 Obtención del suero homólogo y elaboración de la matriz o scaffold

4.4 Aislamiento y cultivo de las células mesenquimales de médula ósea de oveja

4.5 Siembra celular sobre el soporte tridimensional

4.6 Elaboración del soporte para la matriz mediante el uso de fotopolímeros

4.7 Realización del defecto e injerto del cultivo

4.8 Análisis de los datos obtenidos

4.8.1 Análisis radiológico convencional y mediante microtomografía computarizada (micro-CT)

4.8.2 Análisis con microscopía electrónica de barrido (MEB)

4.8.3 Análisis histológico

4.8.4 Análisis estadístico

5. RESULTADOS

5.1 Cultivos celulares in vitro

5.1.1 Crecimiento y caracterización

5.1.2 Diferenciación en la matriz de albúmina

5.2 Camisa de FullCure® y matriz proteica

5.3 Animales de experimentación. Resultados clínicos y macroscópicos

5.3.1 Grupo control

5.3.2 Grupo experimental

5.4 Análisis radiológico convencional mediante tomografía computarizada

5.4.1 Animales sacrificados a las 12 semanas del injerto

5.4.2 Animales sacrificados a las 32 semanas del injerto

5.5 Resultados del análisis mediante micro-TC

5.5.1 Diferencias entre el hueso nativo y el neoformado en cada oveja

5.5.2 Diferencias entre el hueso nativo y el neoformado en cada oveja en función del tiempo de injerto

5.5.3 Diferencias en el hueso neoformado entre el grupo control y el grupo experimental

5.6 Resultados del análisis con microscopia electrónica de barrido (MEB)

5.7 Resultados histológicos

6. DISCUSIÓN

6.1 Nuestro animal de experimentación: la oveja y sus defectos críticos

6.2 Nuestra matriz (albúmina plasmática de oveja) y su soporte (FullCure®)

6.3 El constructo: células mesenquimales de médula ósea diferenciadas en vitro y su matriz

6.4 La ingeniería tisular ósea para la reconstrucción mandibular y su aplicación clínica

6.5 Perspectivas futuras

7. CONCLUSIONES

8. BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INGENIERÍA TISULAR: CONCEPTO E HISTORIA

La ingeniería tisular constituye un campo interdisciplinario, en donde se aplican los principios y métodos de la ingeniería y de las ciencias biomédicas para el desarrollo de sustitutos biológicos que puedan restablecer, mantener o mejorar la función de tejidos dañados.¹

Dicho campo ha presentado un rápido desarrollo en las últimas dos décadas, auspiciado por la necesidad derivada de la práctica clínica de disponer de cantidades suficientes de tejido para reparar defectos quirúrgicos así como para poder reparar órganos completos dañados sin tener que recurrir a la donación.

Además, la generación de tejidos mediante bioingeniería pretende minimizar las secuelas para el paciente derivadas de otras técnicas como la obtención de injertos, donde es frecuente la morbilidad en la zona donante, o evitar el uso de inmunosupresores, en el caso de la sustitución de órganos, gracias a la ausencia de reacción inmune.

El término “ingeniería tisular” comenzó a utilizarse con poca exactitud en la literatura científica a principios de la década de los 80, refiriéndose a la manipulación quirúrgica de órganos y tejidos o, en un sentido más amplio, a la implantación de prótesis o biomateriales.² Su utilización con el sentido con el que lo conocemos hoy en día fue introducida en 1987³. Los primeros años de investigación en ingeniería de tejidos se basaron en enfoques sobre cultivos celulares.

En los primeros años 70, W.T. Green llevó a cabo una serie de experimentos para generar cartílago utilizando una técnica de cultivo de condrocitos en combinación con un soporte óseo.⁴ Pese a su fracaso en la obtención de cartílago neoformado, estableció el concepto, tanto teórico como práctico, de la combinación de células y scaffold.

Otras innovaciones en este campo vinieron de la mano de Burke y Yannas^{5 6 7 8} gracias a un estudio de colaboración entre el Hospital General de Massachussets y el M.I.T., ambos en Boston (USA), con el propósito de generar piel mediante el cultivo de fibroblastos dérmicos o queratinocitos en *scaffolds* proteicos y utilizarlo para el tratamiento de lesiones cutáneas en pacientes quemados. Un punto clave en la ingeniería tisular vino dado por la estrecha colaboración entre el Joseph Vacanti, del Boston Children’s Hospital, y Robert Langer, del M.I.T. Su artículo en *Science* describiendo esta nueva tecnología puede ser considerado el inicio de esta nueva disciplina biomédica.⁹

1.2. ELEMENTOS FUNDAMENTALES DE LA INGENIERÍA TISULAR

Denominamos diseño biomimético a aquel que representa fielmente la forma y la función de los tejidos animales. Combinando células y un soporte de cultivo adecuado, puede conseguirse la construcción de un tejido biomimético. El objetivo de este diseño es crear una réplica de las interacciones in vivo entre factores reguladores, tanto en espacio como en tiempo, permitiendo así que las células se diferencien en el momento y lugar debidos y con el fenotipo adecuado.

En este contexto, la ingeniería tisular aborda el tratamiento de los defectos óseos desde tres perspectivas no excluyentes¹⁰:

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.

Esto requiere tres componentes principales: células, un soporte o *scaffold* y factores de señalización celular, aunque es importante señalar que no necesitamos generar obligatoriamente los tres mediante ingeniería tisular si no que, por ejemplo, podemos fabricar un tejido en laboratorio que, una vez colocado *in vivo*, se exponga a los factores reguladores nativos del organismo.¹¹

1.2.1. TIPOS DE CÉLULAS UTILIZADAS EN INGENIERÍA TISULAR

Es fundamental seleccionar el tipo de célula más adecuado para cada soporte. En ingeniería tisular se han utilizado tanto células autólogas como alogénicas, con diferentes grados de diferenciación.

La opción más obvia sería el uso de células diferenciadas hacia el tipo de tejido que queremos replicar. Estas células se pueden obtener mediante biopsia y cultivadas *in vitro* mediante técnicas estándar antes de ser sembradas en el *scaffold*.¹²

Otra opción que suscita gran interés son las células madre. Se caracterizan por su capacidad de auto-renovación y por ser capaces de diferenciarse hacia una gran variedad de fenotipos celulares.¹³ Pueden ser empleadas con éxito tanto células totipotentes de origen embrionario¹⁴ como células multipotentes denominadas células madre mesenquimales¹⁵. En los últimos años, la ingeniería tisular ha incorporado a su labor un nuevo protagonista: la reprogramación celular¹⁶. Gracias a ello, las células adultas diferenciadas pueden ser genéticamente modificadas y convertidas en células pluripotentes.

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

Pueden obtenerse de diversos tejidos (médula ósea, grasa¹⁷, pared vascular, sangre¹⁸, placenta, líquido amniótico¹⁹, ligamento periodontal, periostio, pulpa dental²⁰ y hueso trabecular) y su característica esencial es la capacidad de diferenciarse hacia distintas líneas celulares^{21 22}, como pueden ser hueso, cartílago, tendón o grasa^{23 24}. 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.1²⁵)

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 fosfatasa alcalina, 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 de 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.

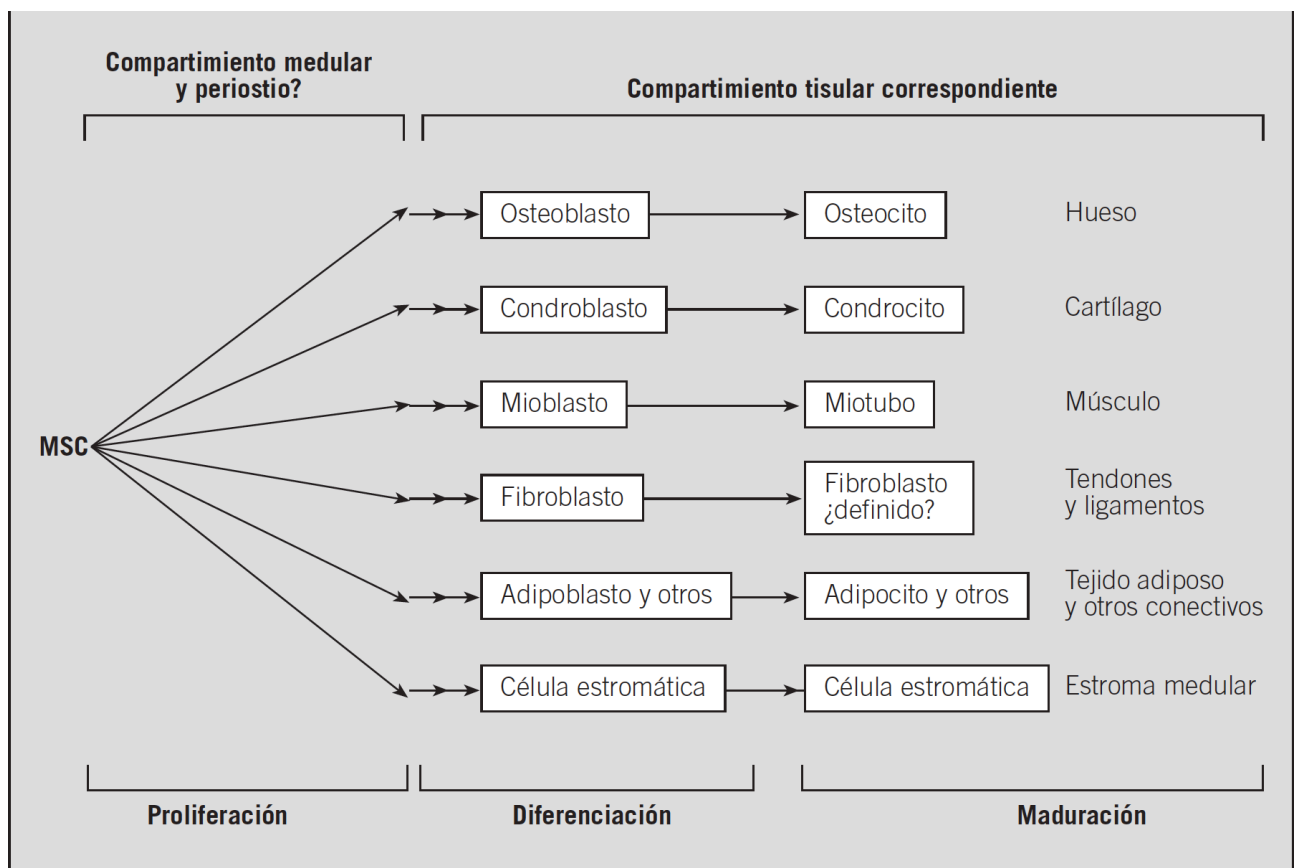


Figura 1: Líneas de diferenciación de las células madre mesenquimales²⁵

- **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 organismo²⁶. 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.²⁷²⁸

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.²⁹

- **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.³⁰ 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.

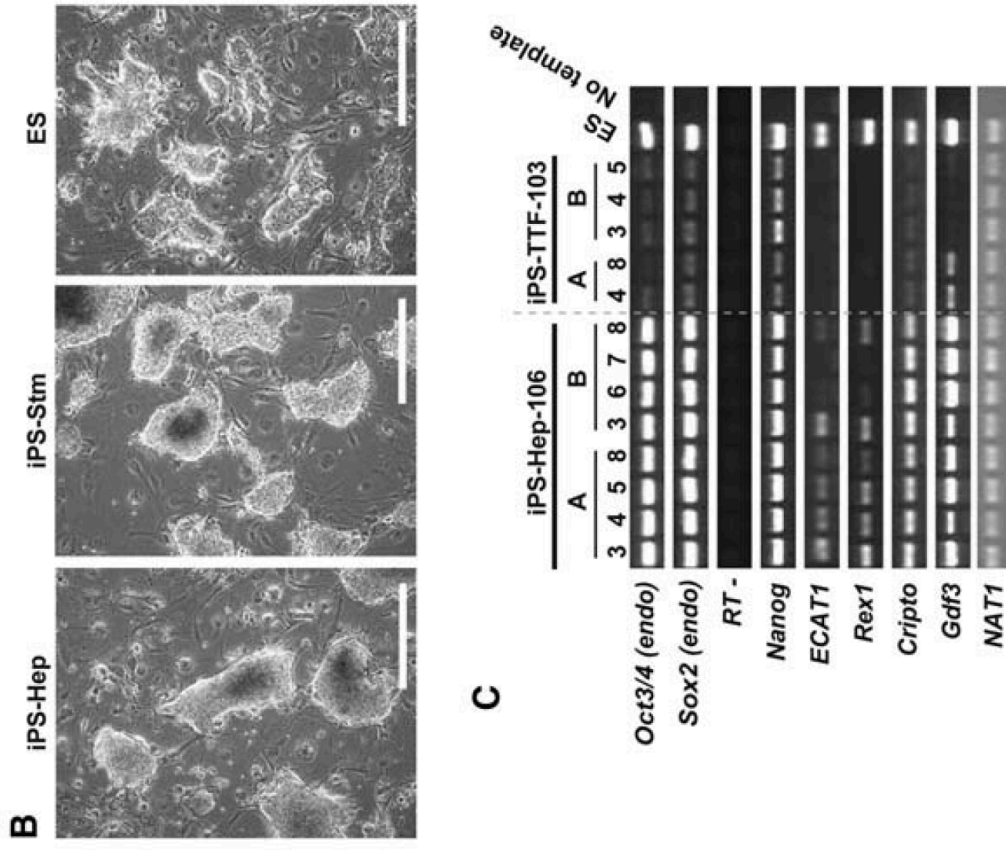


Fig. 1. Characterization of iPS cells from adult mouse hepatocytes and gastric epithelial cells. **(A)** Morphology of a primary culture of hepatocytes and gastric epithelial cells on gelatin-coated plates. Scale bars indicate 50 μm . **(B)** Morphology of iPS-Hep and iPS-Stm cells on STO feeder cells. Scale bars, 500 μm . **(C)** RT-PCR analyses of ES marker gene expression in iPS-Hep cells, iPS-TTF cells, and ES cells. Two culture media were used during retroviral transduction; in clones labeled with A, serum-free medium with EGF and HGF was used, whereas in clones labeled with B, medium containing 10% serum but no EGF or HGF was used. For *Oct3/4* and *Sox2*, we used primer sets that amplified the endogenous transcript only (endo). As a loading control, *NAT1* was used (17). As a negative control, PCR for the *Sox2* was also carried out for the templates without reverse transcription (RT-).

Figura 2: Método de obtención de iPS según la escuela japonesa ³¹

En este sentido, el concepto de reprogramación celular y la obtención de las células IPS (Fig. 2) configuran la más moderna esperanza de la ingeniería tisular.^{16 31}

1.2.2. FACTORES DE SEÑALIZACIÓN TISULAR

La habilidad de las células para percibir y responder de manera coordinada a los cambios existentes en su micro-entorno es fundamental para la reparación *in vivo* de los tejidos. Los factores de señalización celular son sustancias bioactivas que alteran el comportamiento de las células. Estos factores pueden ser utilizados para manipular la conducta de las células de manera deliberada.

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.³²

Uno de los factores más investigados son las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Fue en 1971 cuando Urist divulgó la identificación en la matriz orgánica de una proteína insoluble de bajo peso molecular a la que denominó “bone morphogenetic protein”.³³ Poco tiempo después otros autores aislarían del hueso bovino diferentes polipéptidos de 16-18 y 30KDa de peso molecular, que pasaron a denominarse BMPs 1-3.³⁴

Inicialmente, uno de los grandes problemas que estos métodos de aislamiento presentaban se centraba en que para obtener 1mg de BMP pura se precisaba 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.³⁵

Por otra parte, ya en 1995 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.³⁶ En 2008 publicaron los resultados de su empleo en reconstrucciones mandibulares en humanos.³⁷

1.2.3. MATRICES DE SOPORTE O SCAFFOLDS

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.^{38 39}

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 excreción de residuos.

- **Tamaño de poro:**

El tamaño ideal en la ingeniería ósea se estima entre los 150-190 μ m, aunque existen trabajos que abogan por el uso de matrices con macroporos.⁴⁰

- **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, por ello, han resultado más apropiadas las superficies rugosas que las lisas o suaves.

- **Osteoinducción:**

Esta cualidad, que será descrita en el apartado siguiente, 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 cuanto a forma, del nuevo hueso creado. 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, chitín y chitosán (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 chitosán.⁵¹

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), y fue utilizado por primera vez en 2003 como *scaffold* tridimensional para restituir un cóndilo mandibular porcino, sembrándolo con células madre mesenquimales autólogas.⁴¹

En 2007, Arpornmaeklong y su equipo realizaron un estudio comparativo entre diferentes matrices basadas en el chitosán, combinadas o no con colágeno.⁴² Las células empleadas en este caso fueron células mesenquimales de ratón. La porosidad de las matrices constituyó en este original artículo un interesante apartado, al observar que el colágeno incorporado al chitosán 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 (64-85µm). Hay que tener en consideración que

el tamaño medio de un osteoblasto es de 10-30 μ m 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. Pueden ser de origen natural, como la hidroxiapatita coralina, o bien sintéticas, como la hidroxiapatita sintética o fosfato tricálcico. 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.^{26 43}

- **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 polihidroxibutirato. 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, policaprolactona, polipropileno, policarbonatos, polifosfazoles y polianhídridos.

En la figura 3 se resumen las principales características de las diferentes matrices utilizadas en bioingeniería:

<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 3: Principales características de los distintos tipos de matrices (adaptado de Salgado et al, 2004)⁴¹

1.3. RECONSTRUCCIÓN DE DEFECTOS 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.

Se puede considerar la referencia del Antiguo Testamento en que Eva es creada a partir de una de las costillas de Adán como la primera mención histórica de un trasplante óseo homólogo. Asimismo, la mitología griega recoge referencias sobre implantes y reemplazo de partes del cuerpo, como en la leyenda en la que Zeus ordena reconstruir el hombro de Pelops, hijo de Tántalo, mediante uno forjado a base de marfil.⁴⁴

Tenemos que remontarnos a la Edad Moderna para encontrar la primera referencia científica de un xenoinjerto óseo, con el trabajo de Job Van Meekeren en 1668, quién realizó el primer injerto en un ser humano, trasplantando un fragmento de cráneo de un perro a un soldado herido. El éxito de la cirugía se constató cuando el soldado solicitó que el cirujano retirase el injerto, al haber sido excomulgado por la Iglesia, y no se pudo realizar al encontrarse completamente integrado.⁴⁵

El primer injerto óseo autólogo fue realizado en 1820 en Alemania por el cirujano Philips Von Walter, quien reemplazo un fragmento de cráneo tras una trepanación.

Posteriormente, el cirujano francés Leopold Ollier estudió el fenómeno de la de la regeneración ósea y en 1861 publicó el *“Tratado de la regeneración ósea”*, un documento en el que describía el término “injerto óseo” por primera vez. En esta publicación, citada por Putti⁴⁶ en 1912 como “un trabajo inmortal en el campo de la regeneración ósea”, Ollier sostenía que los segmentos óseos implantados serían viables siempre que incluyesen al periostio, al cual consideraba el factor más importante para la viabilidad del injerto.

La historia de la cirugía de los injertos óseos continúa con las publicaciones de Albee en 1915, donde sentó las bases para el uso de dichos injertos y que aún son de aplicación hoy en día.⁴⁷ En la primera mitad del siglo XX se generalizó su uso y se publicaron numerosos trabajos sobre la materia, centrando la investigación en temas como la reacción inmune a los injertos de tipo homólogo⁴⁸ o la conservación de los

injertos, propiciada por el desarrollo de las técnicas de refrigeración⁴⁹, que permitieron la apertura del primer banco de hueso en 1951 por parte de Mouly, Sicard y Herbert.⁵⁰

1.3.1. 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 hésped.

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.^{51 52}

- **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.^{53 54 55}

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 hésped.

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.

Habitualmente, 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.⁵⁶

1.3.2. CONCEPTO DE DEFECTO SEGMENTARIO CRÍTICO

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 ochenta⁵⁷.

Como norma 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 un 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 la eliminación o mantenimiento del periostio también podría condicionar las dimensiones de un defecto crítico.⁵⁸

En nuestro estudio esta discusión sobre las dimensiones del defecto crítico mandibular en las ovejas queda soslayada por la naturaleza segmentaria, es decir, la ruptura completa de la continuidad ósea de los defectos que se pretenden generar. Sin embargo analizaremos esta cuestión con mayor profundidad en el apartado correspondiente a la discusión del presente estudio.

1.4 CONTEXTO CLÍNICO

La reconstrucción de defectos segmentarios mandibulares continúa siendo un reto para los equipos de investigación biomédica.

Las técnicas habituales más utilizadas pasan por el empleo de injertos libres o de colgajos microvascularizados, que implican largas cirugías así como una importante morbilidad de la zona donante, así como un resultado estético y funcional bastante discutible, no solo causando las secuelas propias de la zona intervenida, si no también a nivel de la zona dadora.

En el caso de tumores malignos es indiscutible la necesidad de realizar una resección rápida de la lesión y tratar de proporcionar un resultado estético y funcional lo mejor posible pero siempre sin olvidarse de que la prioridad es la erradicación de la enfermedad de base.

Muy distinta es la situación de pacientes con lesiones benignas pero localmente agresivas, que requieren de una cirugía de exéresis con márgenes amplios, como pueden ser mixomas o ameloblastomas, con la consecuente secuela estética y funcional que, en este caso, debe ser minimizada al máximo, no siendo aceptada en muchos casos por el paciente la opción reconstructiva con colgajos microvascularizados debido a la morbilidad asociada, el tiempo quirúrgico así como la prolongada hospitalización.

Sería deseable poder usar la opción de la reconstrucción mandibular mediante ingeniería tisular en estos pacientes, ofreciéndoles una opción autóloga, mínimamente invasiva, y sin secuelas a distancia.

Asimismo es importante tener en cuenta el posible uso de la reconstrucción y regeneración ósea mediante ingeniería tisular en el campo de la implantología, donde es habitual el uso de xenoinjerto, fundamentalmente a base de la porción mineralizada de hueso bovino. Pese a que hoy en día es un producto seguro, su origen animal aún produce rechazo a muchos pacientes debido a enfermedades de transmisión por productos animales como puede ser la encefalopatía espongiiforme bovina.

El poder disponer de una opción regenerativa autóloga, mínimamente invasiva, y adaptable a los diversos defectos maxilares, sería un gran avance en el campo de la implantología.

1.4.1 OPCIONES RECONSTRUCTIVAS EN CIRUGÍA MAXILOFACIAL

1.4.1.1 INJERTOS LIBRES

Un injerto es parte de un tejido que se separa de su zona dadora o donante, privándola completamente de su aporte sanguíneo antes de transferirlo al lecho receptor del que se deberá nutrir.

Podemos clasificarlos de varias maneras:

- Según su procedencia:
 - Autoinjerto: del mismo individuo
 - Isoinjerto: de un gemelo univitelino
 - Homoinjerto o aloinjerto: de la misma especie
 - Heteroinjerto o xenoinjerto: de distinta especie
- Según su composición:
 - Cutáneos (epidérmicos y dérmicos)
 - Fascia
 - Tendinosos
 - Nerviosos
 - Vasculares
 - Cartilaginosos
 - Óseos

En reconstrucción de defectos segmentarios mandibulares se utilizarán injertos de tipo óseo.

Entre sus indicaciones encontramos su uso como espaciadores, en reconstrucción de defectos congénitos o adquiridos y como fuente de aporte de células osteogénicas como matriz para la curación de fracturas que no consolidan.

Los injertos óseos esponjosos se revascularizan en horas, por anastomosis entre capilares e invasión de estos gracias a su estructura abierta. Sin embargo, los injertos óseos corticales precisan de una reabsorción osteoclástica e infiltración vascular de los conductos haversianos antes de que se inicie el depósito óseo. Esto precisa de meses y mientras tanto el injerto aumenta en porosidad y disminuye su resistencia. Por tanto, los injertos esponjosos estructuralmente son más débiles que los corticales pero la formación de hueso es más temprana en el esponjoso y mientras su resistencia se mantiene constante, los elementos necróticos son reabsorbidos y remodelados. El injerto óseo cortical muestra una reabsorción incompleta del hueso necrótico y, al final, la mezcla de formación y reabsorción no aporta mayor resistencia al hueso. Por ello, si precisamos una mínima capacidad tensil con revascularización rápida, el hueso esponjoso es de elección.

La reconstrucción de grandes defectos óseos en el esqueleto axial y periférico hace a veces necesario el uso de homoinjertos frescos o de banco, donde estos son preservados y esterilizados por diferentes métodos. Debido a esta diversidad de métodos de conservación, sus propiedades pueden variar.

1.4.1.2 COLGAJOS PEDICULADOS Y MICROVASCULARIZADOS

Un colgajo se define como un segmento de tejido vivo transferido de una posición a otra y que lleva consigo un aporte vascular, que debe ser capaz de mantener la irrigación de los tejidos que traslada desde la zona donante a la receptora, ya sea preservándola (pediculado) o reestableciéndola quirúrgicamente (colgajo libre).⁵⁹

Existen múltiples formas de clasificar un colgajo:

- Según su proximidad al defecto: local o a distancia.
- Según la forma de movimiento del colgajo: rotación, traslación, libre.
- Según el tipo de vascularización: aleatorio, axial, libre.
- Según la composición del tejido transferido: simple, compuesto.
- Según la técnica de disección: pediculado, libre.

1.4.1.2.1. COLGAJOS PEDICULADOS:

Son aquellos que se mantienen fijos al sitio original por su base, desde donde se irrigan. Podemos dividirlos a su vez en locales y regionales o a distancia.

En cirugía de cabeza y cuello son muy utilizados y fundamentalmente aportan tejidos blandos, no siendo el tipo de reconstrucción ideal cuando necesitamos aportar hueso.

1.4.1.2.2. COLGAJOS LIBRES MICROVASCULARIZADOS

La introducción de los colgajos libres basados en la revascularización del tejido transferido al área receptora mediante anastomosis microvascular supuso una revolución en la cirugía reconstructiva de cabeza y cuello debido a su versatilidad y a la calidad de la reparación en caso de defectos complejos, tanto de partes blandas como de hueso, de

forma aislada o combinada, con una tasa de éxito elevada (96-98%).⁶⁰ La reconstrucción mediante colgajos microvasculares requiere una planificación cuidadosa, incluyendo un adecuado conocimiento de la anatomía vascular del área receptora, especialmente en caso de reconstrucción secundaria. En la actualidad existen técnicas digitales que permiten desarrollar modelos tridimensionales que han supuesto un gran avance en la evaluación y planificación de la reconstrucción.

1.4.1.3 XENOINJERTOS

Los xenoinjertos o injertos heterólogos son aquellos cuyo dador es un individuo de una especie diferente a la del sujeto al cual se le va a transplantar.

Actualmente los más comunes son los obtenidos del coral así como de fuentes bovinas y porcinas.

El principal problema derivado de su uso radica en la potencial transmisión de zoonosis y de enfermedades producidas por priones, como la encefalopatía bovina espongiiforme. Para ello requieren de un procesamiento previo a su implantación, donde no sólo se debe prevenir la transmisión de infecciones sino también anular sus propiedades antigénicas para evitar el rechazo en el huésped. Debido a este procesamiento, el hueso pierde su propiedad osteogénica y parcialmente la osteoinductiva, por lo cual el resultado clínico será más pobre que el conseguido mediante el uso de autoinjertos.⁶¹

1.4.1.4 INJERTOS ÓSEOS SINTÉTICOS

Los materiales de regeneración ósea sintéticos o aloplásticos se fabrican a partir de materia prima mineral, están bien definidos en su composición y se encuentran disponibles de forma ilimitada. Se puede descartar categóricamente tanto la transmisión de enfermedades como las reacciones de rechazo a los antígenos del donante.

Los pacientes no tienen en general ningún conflicto ético con respecto al material sintético, mientras que sí se puede dar el caso si se trata de materiales alogénicos y xenogénicos.

Los materiales de reconstrucción ósea aloplásticos que se colocan más frecuentemente están compuestos de fosfato de calcio, como por ejemplo β -trifosfato de calcio e hidroxiapatita. Los fosfatos cálcicos se han utilizado en cirugía oral desde hace

más de 20 años con muy buenos resultados y están documentados científicamente.⁶² Su reabsorción depende de la composición y pueden ser desde totalmente reabsorbibles hasta prácticamente irreabsorbibles.

Su principal desventaja es que sólo pueden ser utilizados para regeneración de pequeños defectos óseos en los maxilares. No obstante, son ampliamente utilizados en el campo de la implantología, donde se utilizan para preservar la altura y anchura alveolar tras extracciones dentales o para realizar injertos de seno maxilar entre otras aplicaciones.

1.4.1.5 INGENIERÍA TISULAR

El futuro de la reconstrucción mandibular pasa por las técnicas de ingeniería tisular, mediante las cuales se pretende alcanzar la regeneración ósea evitando la morbilidad asociada de las técnicas anteriormente descritas.

Además de las características de los injertos óseos comentadas en apartados anteriores, debemos de tener en cuenta que dicho constructo debe de ser capaz de sobrevivir en un entorno con una pobre vascularización, como en aquellos defectos mandibulares debidos a osteoradionecrosis o infecciones.⁶³

Una alternativa a la creación *in vitro* de constructos tisulares que luego serán implantados en el defecto es la utilización de factores de señalización celular que estimulen la formación ósea *de novo*, como es el caso de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2).³⁷

Otro desafío al que se enfrenta la ingeniería tisular es a la regeneración de defectos de gran tamaño, considerados como defectos críticos. El uso de bioreactores parece ser una alternativa a la reconstrucción habitual mediante el uso de colgajos microvascularizados cuando tenemos un defecto mandibular de gran tamaño.⁶⁴ Mediante esta estrategia, un bioreactor del tamaño y geometría deseadas es implantado en una localización a distancia del defecto con el fin de estimular el crecimiento de tejidos mineralizados. Estos tejidos pueden ser entonces extraídos y transferidos al defecto craneofacial como si fuera un colgajo libre microvascularizado, autólogo, con la geometría y tamaño deseados.

Dichos bioreactores consisten en un dispositivo mediante el cual se consigue el crecimiento de células o tejidos, manteniendo unas condiciones óptimas de pH,

temperatura, oxígeno, etc. Permiten el control preciso y continuo de estas condiciones específicas, así como añadir factores específicos al cultivo celular.

De momento su uso en clínica, combinado con factores de crecimiento exógenos, ha mostrado una aplicación limitada⁶⁵, dado que la presencia de patologías malignas es una contraindicación absoluta para el uso de factores de crecimiento y una gran parte de los defectos craneofaciales susceptibles de reconstrucción vienen causados por la resección de un tumor maligno de cabeza y cuello. Por ello, lo ideal sería desarrollar un biorreactor que no necesitase del uso de estos factores de crecimiento.

Por otra parte, estos biorreactores necesitan de alguna sustancia que actúe como *scaffold* para permitir el desarrollo y crecimiento celular. Habitualmente se usa hueso particulado de cresta ilíaca del propio paciente, lo cual no genera ninguna ventaja en términos de morbilidad con respecto al uso de colgajos microvascularizados. La investigación actual pretende desarrollar algún otro tipo de matriz que sustituya al uso de hueso autólogo y evite la morbilidad adicional en el paciente.

2. ESTADO ACTUAL

2.1 ESTADO ACTUAL DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN EN RECONSTRUCCIÓN MANDIBULAR DE NUESTRO EQUIPO

A lo largo del año 2009 un equipo de investigación constituido por cirujanos y biólogos del Principado de Asturias analizó el comportamiento *in vivo* de un nuevo constructo constituido por células osteoproductoras obtenidas mediante cultivo *in vitro* de osteoblastos mandibulares humanos sobre una matriz de albúmina, patentada por el Centro de Sangre y Tejidos⁶⁶

Para estudiar el comportamiento histológico, inmunohistoquímico y densitométrico (a partir de tomografías computarizadas) del nuevo producto elaborado mediante Ingeniería Tisular Osea (ITO). se utilizaron ocho ratas atímicas de la estirpe *rnu/rnu* machos, de entre 11 y 12 semanas de edad y con un peso aproximado de 260 gramos por espécimen.

A estos animales se les generaron defectos críticos mandibulares (bicorticales, 5 mm de diámetro) empleando una fresa circular de acero montada en un motor eléctrico estéril, con abundante irrigación con suero salino. Los defectos creados se situaron en el cuerpo-rama ascendente mandibular. En cada uno de los animales se crearon sendos defectos, de igual diámetro y posición, en ambas hemimandíbulas (Fig.4):

- En el lado derecho los defectos fueron rellenados mediante la introducción de láminas de 5 mm de diámetro de la matriz embebida en las células cultivadas.
- En el lado izquierdo, los defectos creados no fueron cubiertos ni rellenados por ningún injerto ni material exógeno, sirviendo así como control. Los animales fueron sacrificados a las 5 semanas (2 animales), 8 semanas (2 animales) y 11 semanas (2 animales). Dos animales fallecieron por causas desconocidas.



Fig. 4: Rata atímica durante la cirugía del defecto mandibular experimental

Los resultados fueron espectaculares, especialmente en aquellos animales con mayor tiempo de injerto. En los defectos control no se objetivó formación ósea en ninguno de los animales del estudio en las tomografías computarizadas. (Fig. 5).

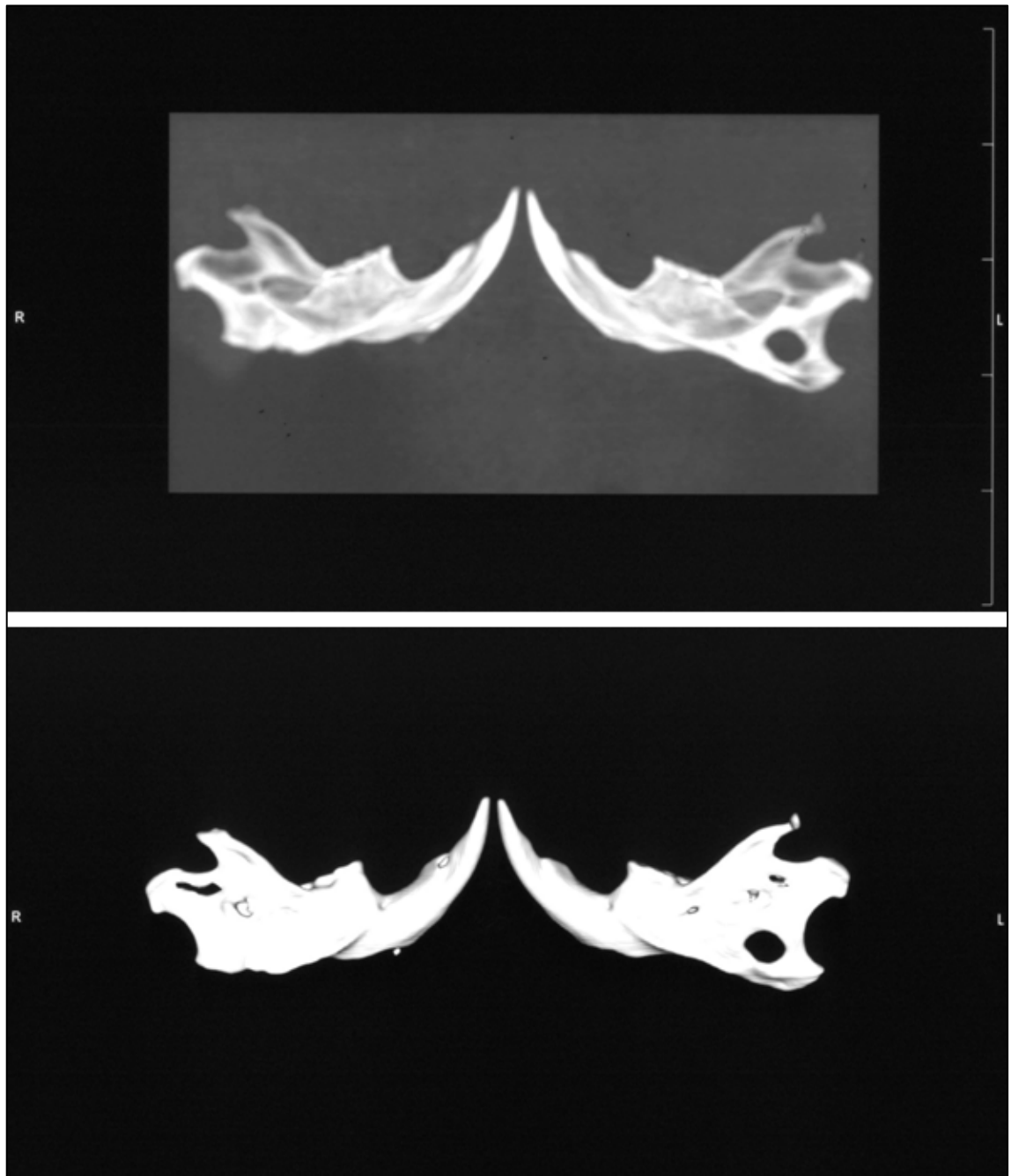


Fig. 5: Imagen de TC y reconstrucción 3D correspondiente a las hemimandíbulas de rata a las 11 semanas (lado derecho injertado). El lado izquierdo corresponde al control.

Histológicamente, a las 11 semanas, resultó difícil identificar restos de la matriz en las preparaciones, tanto de hematoxilina-eosina (HE) como de Von Kossa (VK), revelando una reabsorción casi completa del mismo en ese período. La tinción de VK evidenció pequeñas áreas puntiformes rojo intenso (restos aislados del soporte proteico), completamente inmersos en matriz mineralizada en forma de depósitos marrones.

Toda esta línea de investigación ha sido publicada en el año 2010 en diferentes revistas internacionales, en las que se detalla con más precisión las particularidades de los experimentos realizados^{81 82 83}

En el año 2012 un equipo de investigación que incorporaba a cirujanos maxilofaciales del Hospital del Río Hortega y a biólogos del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid, profundizaron sobre nuestra línea de investigación, con el objetivo de evaluar el comportamiento in vivo del nuevo producto de ITO en animales pequeños. En uno de sus estudios⁶⁷, utilizaron 12 ratas atímicas (*rnu/rnu* machos, de entre 11 y 12 semanas de edad) a las que se les practicó un defecto crítico de 4 mm de diámetro mayor y espesor total en los ángulos mandibulares. En el lado derecho los defectos se rellenaron con la matriz embebida en células osteoformadoras diferenciadas de origen humano; en el lado izquierdo los defectos fueron injertados con la matriz sin células elaborada a partir de plasma también de origen humano. Las 12 ratas se dividieron en dos grupos. El grupo 1 (seis ratas) se diferenciaba del grupo 2 (seis ratas) en que en estas últimas, tanto en el defecto mandibular derecho como en el izquierdo se aplicó una membrana reabsorbible de recubrimiento de ácido poliglicólico-poliláctico (BioMesh-S®) adherida al hueso con pegamento quirúrgico estéril (Glubran®). Las variables a investigar fueron la influencia que la presencia de células pudiera tener en la formación de hueso y las variaciones que en este proceso se pudieran producir por la utilización o no de la membrana. La cuantificación de los resultados se realizó mediante histología convencional y a través de los estudios de TC analizados mediante el programa Oxiris en los tres planos del espacio (Fig. 6). Todos los animales fueron sacrificados a las 12 semanas (T12) de la aplicación del injerto.

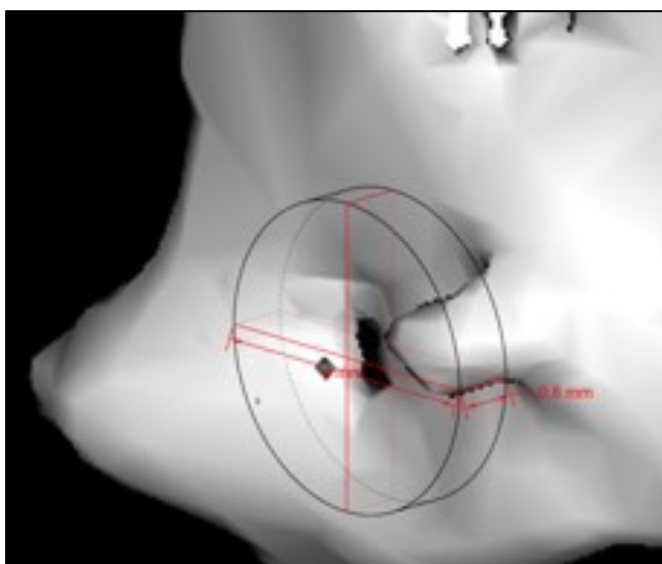


Fig. 6: Superposición del cilindro y las ROIs en la reconstrucción tridimensional de las mandíbulas extraídas de los animales de experimentación. (Cortesía: de la Peña et al, 2014)

En sus resultados, observaron que, en los estudios de imagen, los valores densitométricos obtenidos en relación con la neoformación ósea, dependían del plano espacial que se considerara, pudiendo ser significativamente favorables para las hemimandíbulas injertadas con células y scaffold en un plano (habitualmente el axial), cuando no se utilizaban membranas, pero también significativamente favorables para el mismo plano con el injerto de matriz acelular cuando se utilizaban membranas. Sin embargo, al analizar los valores obtenidos en la variable matriz acelular sin membranas (hemimandíbulas izquierdas del grupo 1) frente a la variable matriz acelular con membranas (hemimandíbulas derechas del grupo 2) la densidad radiológica obtenida fue mayor en las hemimandíbulas del grupo 2 en el plano axial, pero en el plano coronal la densidad resultó ser mayor en el grupo 1 (matriz sin membrana).⁷⁷

Histológicamente, el proceso de regeneración ósea, el grado de madurez del tejido óseo neoformado y la persistencia de restos del *scaffold* fueron equivalentes en los cortes obtenidos de las hemimandíbulas derechas e izquierdas de las ratas de ambos grupos, para los mismos tiempos de injerto.

Recientemente el mismo grupo de investigación de cirujanos orales y maxilofaciales y del IBGM de Valladolid, han publicado el primer ensayo clínico de ITO que analiza el producto desarrollado (BioMax) para la reparación de lesiones quísticas de los maxilares en humanos con prometedores resultados.⁶⁸

Toda esta línea de investigación nos hizo conscientes de la necesidad de trasladar la experimentación hacia animales de mayor tamaño, a los que pudiéramos provocar defectos en la continuidad mandibular como los que habitualmente sufren los pacientes de nuestra especialidad por diferentes causas.

De otra parte, una cuestión fundamental a la que con nuestra experimentación previa no habíamos dado respuesta era la de conocer el potencial osteogénico que de manera aislada (sin componente celular) pudiera tener la matriz proteica utilizada en nuestros experimentos.

Estas dos premisas soportan la base del presente trabajo de Tesis Doctoral

2.2 LA OVEJA COMO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

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 y 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.

Son muchos los factores que condicionan la elección de un modelo de experimentación animal para evaluar estrategias de regeneración ósea.⁵⁷ Para la regeneración ósea mandibular, los modelos animales generalmente se dividen en modelos de pequeños animales, (ratones, ratas y conejos) y modelos con animales grandes (perros, cerdos, monos y ovejas). Los modelos de pequeños animales se utilizan habitualmente por consideraciones éticas, económicas y estadísticas, mientras que los modelos de animales grandes se usan principalmente cuando los modelos de animales pequeños no son apropiados para la reproducción de la situación clínica que se pretende resolver en el ser humano.⁶⁹

En el período comprendido entre 1990 y 2011, las ovejas fueron utilizadas en 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 1990. 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, en 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 intraútero.

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 posibilitan que la oveja pueda criar de nuevo tras una intervención quirúrgica.

Algunas desventajas también deben de 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 las muestras necesarias
- Que se pueda mantener en instalaciones habituales y poco complejas
- Bajo coste 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.

En cuanto a la anatomía de la oveja, macroscópicamente, los huesos del cráneo pueden representar al humano de una forma relativamente fiel (Fig. 7), aunque histológicamente la estructura ósea de la oveja es bastante diferente. (Fig. 8)

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.

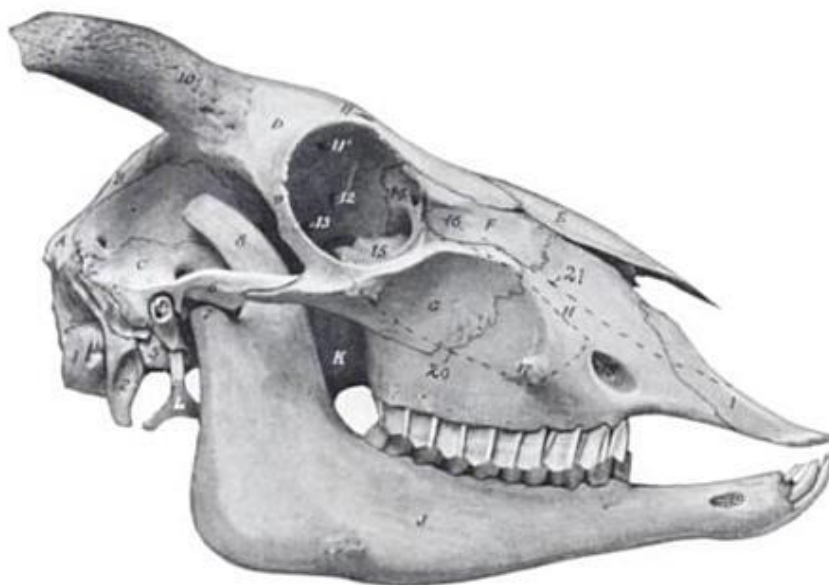


Fig. 26-61. Cráneo de la oveja; vista lateral.

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 hioideos; 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 facial; 17, tuberosidad facial; 18, foramen infraorbital; 19, foramen mental; 20, contorno del seno maxilar; 21, trayecto del conducto nasolagrimal.

Fig. 7: Estructura del cráneo de una oveja (Sisson et al, 1933)

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

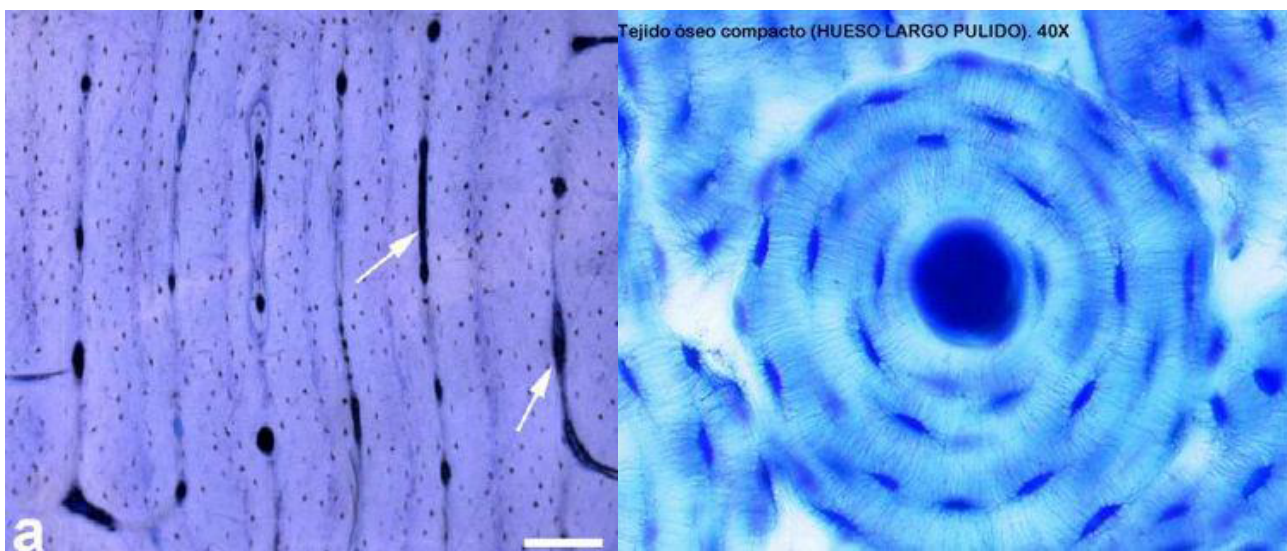


Fig. 8: Izquierda: Sección ósea de tibia de oveja, teñida con azul de toluidina, mostrando la apariencia laminar del hueso cortical. Derecha: sección ósea de hueso humano, usando la misma tinción.

En el apartado de la discusión analizaremos con mayor profundidad las ventajas e inconvenientes que tras el presente estudio, hemos observado en relación con la oveja como animal de investigación en el territorio maxilofacial.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible la regeneración ósea de un defecto segmentario mandibular mediante la diferenciación osteogénica de células mesenquimales de médula ósea en ovejas en una matriz de albúmina procedente del suero?

¿Qué características histológicas, tomográficas y microtomográficas presentará el hueso neoformado?

3.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO:

3.2.1 La reparación ósea de osteotomías segmentarias mandibulares en ovejas puede alcanzarse mediante el empleo de células mesenquimales autólogas de médula ósea cultivadas in vitro.

3.2.2 El hueso neoformado con esta metodología presenta similitudes histológicas y radiográficas con el hueso nativo mandibular de la oveja experimental.

3.3 OBJETIVOS:

3.3.1 Desarrollar un equivalente óseo in vitro, mediante el empleo de células mesenquimales de médula ósea de oveja, cultivadas en un novedoso soporte tridimensional derivado de la albúmina plasmática autóloga.

3.3.2 Injertar el producto desarrollado mediante ingeniería tisular en soluciones de continuidad de 30mm creadas mediante mandibulectomías segmentarias en 15 ovejas.

3.3.3 Realizar una evaluación clínica, radiológica e histológica de los defectos injertados en dos períodos de tiempo (12 semanas / 32 semanas).

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Al objeto de dar respuesta a nuestra hipótesis planteamos un diseño experimental constituido por cuatro grupos de estudio. A saber:

-Grupo control (C): constituido por los animales de experimentación a los cuales se les implantó en el defecto segmentario mandibular exclusivamente una matriz proteica sin componente celular.

A su vez, este grupo control se dividió en dos subgrupos:

- Animales control sacrificados a las 12 semanas (CT12)
- Animales control sacrificados a las 32 semanas (CT32)

-Grupo experimental (E): incluía los animales de experimentación a los cuales se les implantó en el defecto segmentario la matriz con cultivo de células de médula ósea diferenciadas.

Del mismo modo se subdividió en dos grupos, según el tiempo de sacrificio:

- Animales experimentales sacrificados a las 12 semanas (ET12)
- Animales experimentales sacrificados a las 32 semanas (ET32)

Partiendo de un total de 15 animales de experimentación, los grupos asignados quedaron configurados como se recoge en la tabla 1:

	AUSENCIA DE CÉLULAS MESENQUIMALES	PRESENCIA DE CÉLULAS MESENQUIMALES
SACRIFICIO A LAS 12 SEMANAS	CT12 = 2	ET12 = 5
SACRIFICIO A LAS 32 SEMANAS	CT32 = 3	ET32 = 5

Tabla 1: Número de sujetos de experimentación asignados a cada grupo.

4.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron un total de 15 ovejas hembra de estándar racial no definido, con una edad comprendida entre los 12 y los 15 meses y un peso medio de 59,2 kg (57,3kg-64,8kg). (Fig. 9)



Fig. 9: Oveja de estándar racial no definido, en el recinto del Bioterio de la Universidad de Oviedo, antes de la cirugía.

Para dicha experimentación se siguieron en todo momento las directrices de la Unión Europea (2010/63/UE⁷⁰) así como la legislación española referente al uso animal con fines de investigación (RD 53/2013, de 1 de Febrero)⁷¹. Asimismo, el protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Oviedo. Se procuró en todo momento minimizar el sufrimiento animal y reducir el número de animales usados.

La provisión, transporte, asentamiento y manutención de las ovejas corrió a cargo del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), manteniéndose los animales en pastos controlados pertenecientes a dicha institución y no resultando estabulados en ningún momento, salvo para las cirugías.

Todas las intervenciones quirúrgicas fueron realizadas en el Bioterio de la Universidad de Oviedo (Unidad de Bioterio e Imagen Preclínica, Campus de 'El Cristo', Universidad de Oviedo).

Las ovejas del estudio fueron sometidas a dos anestésias generales por un veterinario experto. En la primera de ellas, se procedió a la obtención de la sangre para la elaboración de la matriz (Grupo Control: 5 ovejas) y en diez animales se asoció a este proceder la toma de muestras (pequeños fragmentos óseos mandibulares) y/o la realización de una punción de médula ósea. Al mes de este procedimiento se aplicaba otra anestesia general para la realización del defecto mandibular, inducida con Propofol (*Vetofol^R*, Barcelona, España) y mantenida con Isoflurano a concentraciones entre el 1.2 y el 2.5% (*Isoflo^R*, Barcelona, España). Todas las cirugías fueron realizadas en condiciones de asepsia y antisepsia, por dos cirujanos (cada uno de ellos con un ayudante) utilizando la misma técnica operatoria. (Fig. 10)



Fig. 10: Imagen del equipo de cirujanos en el Bioterio de la Universidad de Oviedo

Con relación a la identificación de los animales, el Reglamento (CE) n.º 21/2004, del Consejo, de 17 de diciembre de 2003, por el que se establecía un sistema de identificación y registro de los animales de las especies ovina y caprina y modificaba el Reglamento (CE) n.º 1782/2003 y las Directivas 92/102/CEE y 64/432/CEE fue adaptado por una nueva Disposición (Real Decreto 685/2013, de 16 de septiembre) cuyas indicaciones se fueron aplicadas en todos los animales del presente estudio. La marca auricular consiste en un *crotal* de plástico que se colocó, en la oreja derecha del animal, con una numeración que cumplimentaba las características legales pre-establecidas. (Fig.11)



Fig. 11: Crotal de plástico colocado en la oreja derecha del animal con la numeración establecida para su registro e identificación.

Cuatro horas después de ser intervenidas, las ovejas fueron devueltas a su entorno natural y clasificadas en dos grupos en función del momento de su sacrificio: el primero a las 12 semanas, y el segundo a las 32 semanas, tal y como se indicó previamente. (Fig. 12)



Fig. 12: Ovejas en su entorno natural

Finalmente, para su eutanasia se administró una sobredosis de Pentobarbital sódico 100mg/kg por vía intravenosa. Al objeto de posibilitar la conservación y manipulación ulterior de las muestras se procedió a la sección de las cabezas de los animales y a su congelación, por parte del personal cualificado del Bioterio de la Universidad de Oviedo.

4.3 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA Y OTROS PROCEDIMIENTOS APLICADOS PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS

4.3.1 PUNCIÓN DE LA CRESTA ILÍACA BOVINA

La obtención de las células mesenquimales de médula ósea se realizó mediante punción a nivel de la cresta ilíaca del animal. Para ello, se procedió en un primer lugar a la

anestesia general, (Propofol e Isoflurano) con intubación orotraqueal ejecutada por un veterinario del Bioterio (Dña. Teresa Sánchez Álvarez)

Una vez anestesiado y estabilizado el animal se procedió a la recogida de médula ósea autóloga (5-10 ml) de la cresta ilíaca de la oveja, utilizando un trócar previamente enjuagado con heparina (*Hospira Prod. Farm. SL, Madrid, Spain*). En la figura 13 se ilustra este procedimiento,

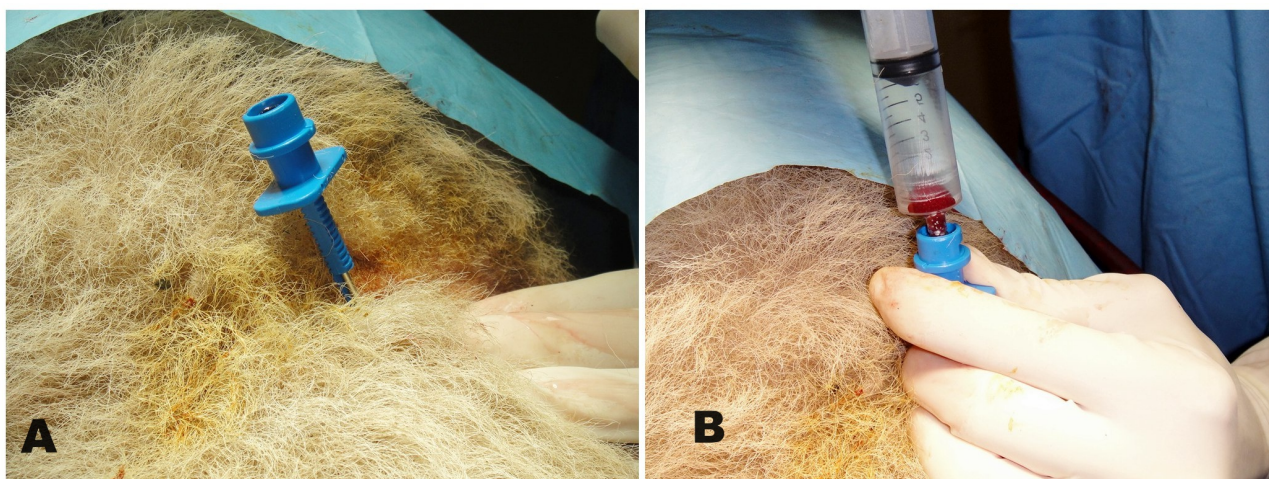


Fig. 13: Obtención de células mesenquimales de médula ósea. A: punción con trócar. B: aspiración de médula ósea.

4.3.2 OTROS PROCEDIMIENTOS DE OBTENCIÓN CELULAR

Previamente a la obtención celular procedente de la punción de la cresta ilíaca, se obtuvieron muestras de fragmentos óseos del maxilar superior obtenidos por vía oral (Fig. 14) . Las tres muestras de diferentes animales, obtenidas por este procedimiento, fueron desechadas por contaminación fúngica y por no obtenerse crecimiento en el cultivo celular.



Fig. 14: Obtención de fragmentos óseos del maxilar superior por vía intraoral

Por esta razón, se abandonó este procedimiento sustituyéndolo por un abordaje externo del ángulo mandibular izquierdo y la obtención de cilindros de hueso cortico-esponjoso empleando una trefina de 5mm (Mozo-Grau, Valladolid, España) (Fig. 15)



Fig. 15: Obtención de cilindros óseos de mandíbula mediante trefina

Tampoco pudimos obtener cultivos celulares viables con este procedimiento por contaminación o falta de crecimiento celular, por lo que el único tipo de células empleado en el presente estudio procedía de las punciones de médula ósea de la cresta iliaca de los animales de experimentación.

4.3.3 OBTENCIÓN DEL SUERO HOMÓLOGO Y ELABORACIÓN DE LA MATRIZ O SCAFFOLD

Para confeccionar el scaffold, se obtuvieron 20ml de sangre venosa de cada oveja durante el mismo procedimiento en el que se realizó la punción de la cresta ilíaca.

La muestra sanguínea fue mantenida sin anticoagulante durante 30 minutos a 37°C para permitir la retracción del *clot* de fibrina y, posteriormente, centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos.

El suero obtenido (aproximadamente 10 ml) fue cruzado con 0,5 ml de glutaraldehído al 25% (Merck, Darmstadt, Alemania) e inmediatamente transferido a un molde de silicona de 30mm de longitud, fabricado a medida (*Fundación Pro dintec*, Gijón, España), con el fin de mimetizar la estructura del fragmento mandibular bovino que será seccionado (Fig. 16).

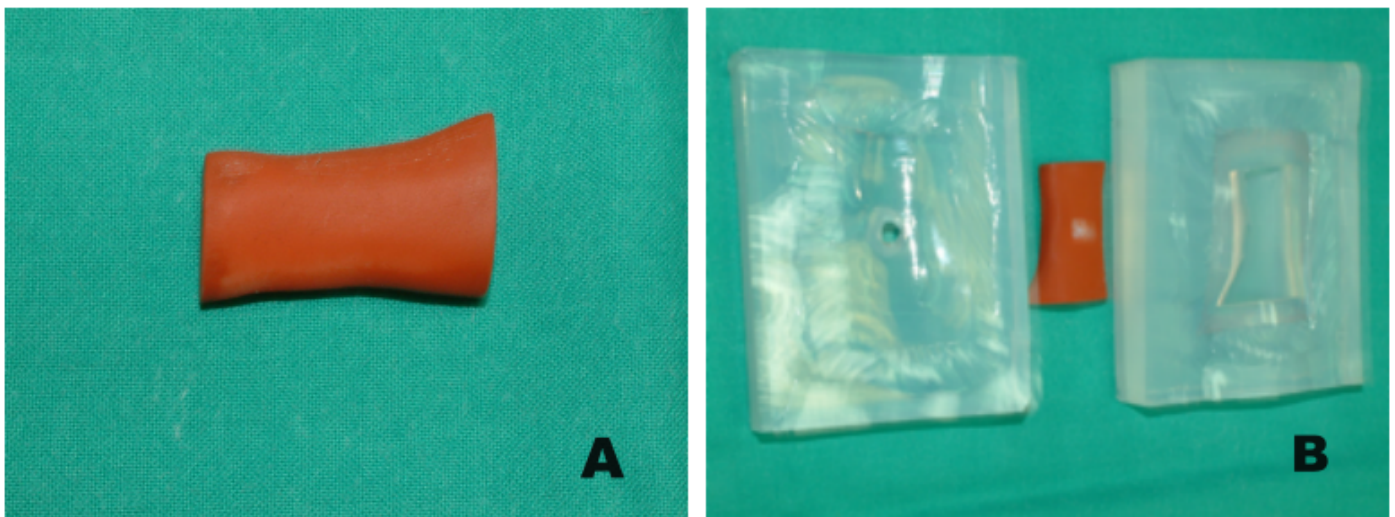


Fig. 16A: Reproducción tridimensional del defecto creado. 16B moldes de silicona realizados en base al defecto creado.

El molde fue mantenido a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta la solidificación de la matriz y, posteriormente, transferido al congelador, manteniéndolo a -

70°C toda la noche. Tras este proceso, la matriz fue liofilizada durante 24 horas para su posterior rehidratación en etanol en concentraciones decrecientes (100%-90%-80%, 1 hora en cada uno) y mantenida en etanol al 70% durante 8 horas para su esterilización.

Tras lavar la matriz repetidas veces con DMEM-F12 para eliminar los restos de etanol, el resultado conseguido fue una esponja cilíndrica de soporte tridimensional semejante a la obtenida en estudios previos⁸⁶, pero con una morfología congruente con el defecto quirúrgico a reparar en las mandíbulas de las ovejas (Fig. 17)

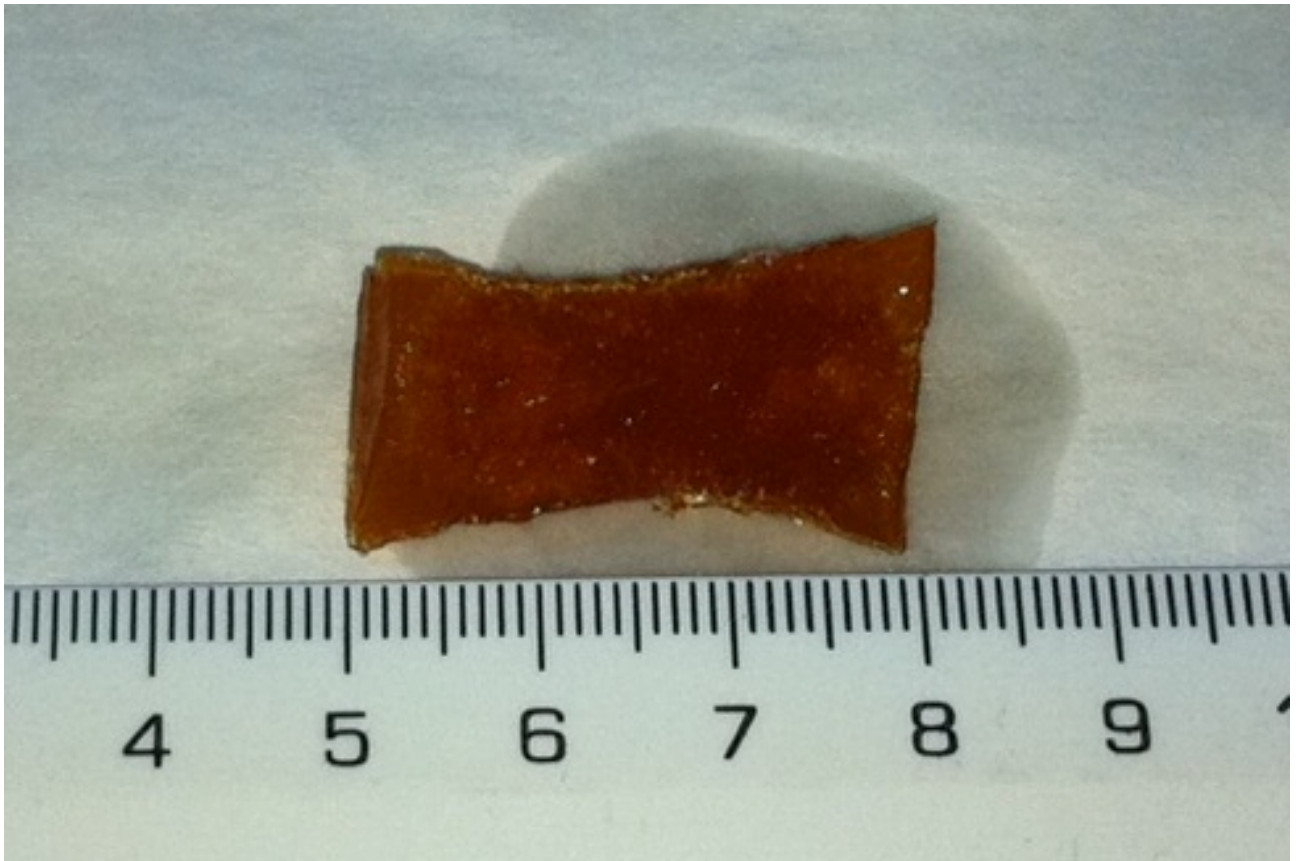


Fig. 17: Visión macroscópica de la esponja de soporte tridimensional obtenida a partir de la sangre de oveja con la morfología congruente con el defecto.

4.4 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA DE OVEJA

Las células mononucleares (MNCs) obtenidas por las punciones de la cresta ilíaca de las ovejas del grupo experimental fueron aisladas utilizando el gradiente de densidad

de Ficoll (Biocoll separating solution, 1.077 g/ml, Biochrom AG, Berlin, Alemania), mediante centrifugado durante 25 minutos a 400g, 20°C.

Posteriormente, tras doble lavado con solución salino, se procedió a sembrar el pellet en placas de 12,5 cm² con 3 ml de medio de cultivo, DMEM/Ham's 12, suplementado con un 20% de suero fetal bovino + solución antibiótica/antimicótica (50U/ml de penicilina + 50µg/ml de estreptomycin).

El cultivo se mantuvo hasta confluencia en una atmósfera controlada (5% de CO₂, 95% aire y 37°C).

Las células madre mesenquimales de médula ósea fueron utilizadas tras 4-5 pases con el fin de obtener un total de 8-10 frascos de cultivo de 150 cm² con confluencia celular, con aproximadamente 25-30x10⁶ células para cultivar en el scaffold o matriz. (Fig. 18)

Centrifugación mediante gradiente de densidad con Ficoll

Expansión celular in vitro en medio de cultivo

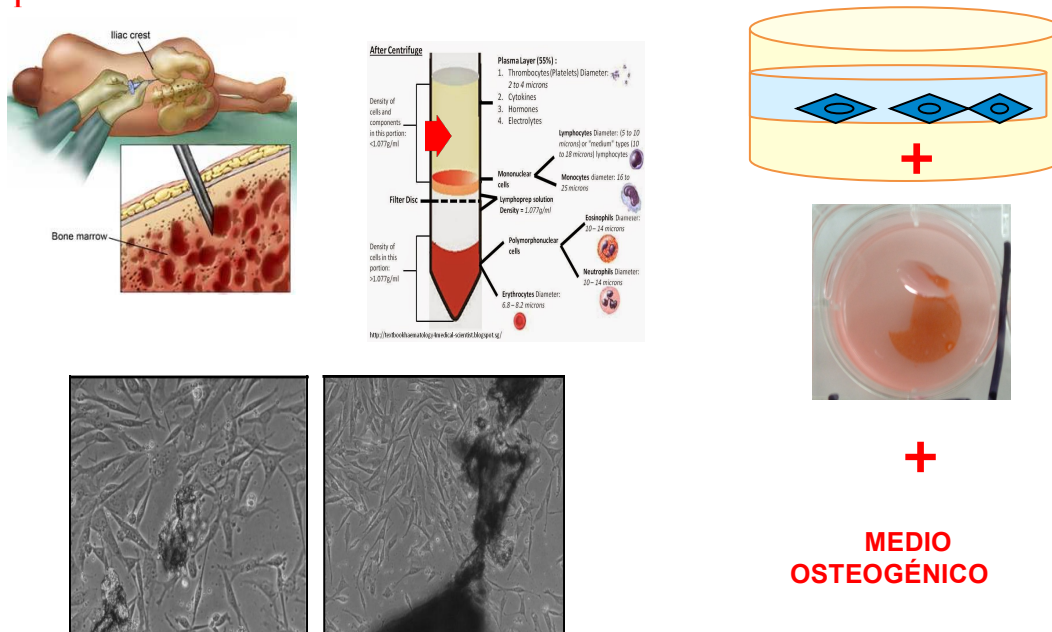


Fig. 18: Representación esquemática del procesamiento y la caracterización de las células obtenidas

La caracterización del fenotipo de las células cultivadas in vitro se realizó mediante un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSAria, con el programa FACSDiva 6.1.2. Se analizaron las células procedentes del cuarto pase de solo una de las ovejas experimentales (mínimo de 1×10^5). Las células fueron incubadas con agente bloqueante FcR (eBioscience) durante 20 minutos a 4°C. A continuación las células fueron teñidas con los anticuerpos y su isotopo de control durante 30 minutos.

.Los anticuerpos empleados fueron los propuestos por Dominici et al.⁷²:

- **CD34**, (*PE Mouse Anti-Human CD34 monoclonal, BD Pharmingen*)
- **CD73** (*PE Mouse Anti-Human CD73 monoclonal, BD Pharmingen*)
- **CD90** (*PE-CyTM5 Mouse Anti-Human CD90 monoclonal, BD Pharmingen*)
- **CD105** (*Mouse Anti-Human CD105, Abcam*)
- **CD45** (*FITC Mouse Anti-Human CD45 monoclonal, BD Pharmingen*)
- **CD44** (*Mouse Anti-Sheep CD44:FITC monoclonal, AbD Serotec*).

El fenotipo celular de las células mesenquimales de la médula ósea fue positivo para CD44, CD105 y CD90. La positividad observada frente a CD73 (antihumano) fue menor: Los marcadores para CD34 y CD45 fueron negativos (Fig. 19).

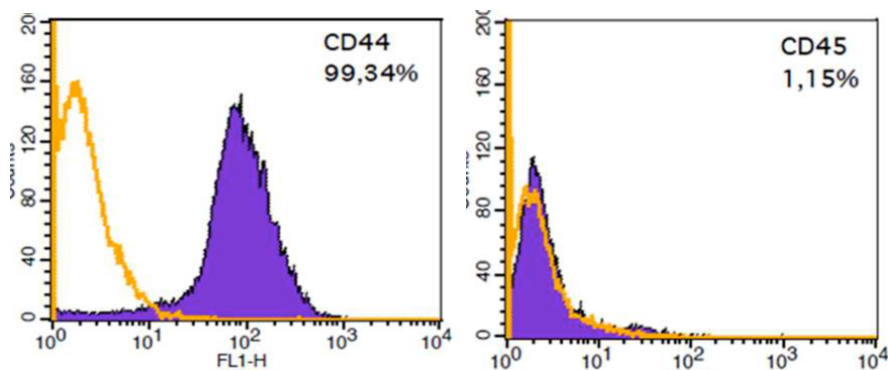


Fig. 19: Fenotipo celular de la única muestra investigada con positividad CD44 y negatividad CD45.

4.5 SIEMBRA CELULAR SOBRE EL SOPORTE TRIDIMENSIONAL

El *pool* celular obtenido fue resuspendido en 5ml de medio completo y sembrado en la matriz o scaffold, pasando a ser incubado durante 24 horas en la misma atmósfera controlada a 37°C y 5% de CO₂, con una suave agitación.

Se recogió el medio sobrante y se centrifugó a 1500rpm durante 10 minutos, siendo resuspendido el *pellet* obtenido en 5ml de medio completo.

De nuevo se procedió a incubar mediante el mismo sistema durante 24 horas, tras las cuales se eliminó el medio sobrante y se sustituyó por medio de **cultivo osteogénico**, compuesto por DMEM suplementado con dexametasona 10 nM, β-glicerofosfato 10 nM, ácido ascórbico 0,28 nM y 10% SBF (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*).

El scaffold fue mantenido durante **3 semanas** en dicho medio de cultivo osteogénico a 37°C, en atmósfera húmeda al 5% de CO₂, cambiándose el medio dos veces a la semana.

El comportamiento del constructo (matriz–células diferenciadas) fue testado mediante microscopio electrónico de barrido (MEB). Para ello se fijó con glutaraldehído 0,1 M y tampón fosfato al 2% (PBS, *Gibco, Inglaterra*) durante 12 horas. A continuación se deshidrató con series graduales de acetona de menor a mayor concentración (30-50-70-90-100%). Tras este paso, la muestra se secó utilizando la técnica del punto crítico de CO₂ con el aparato *Baltec CDP 030 critical point dryer*. Después se roció con una película de oro para ser visualizada con el MEB (modelo JEOL JSM 6100). Se pudo comprobar que la matriz estaba compuesta por microporos de entre 150-300 μm de diámetro con un gran número de interconexiones entre ellos objetivando una favorable adaptación de las células a la matriz (Fig. 20).

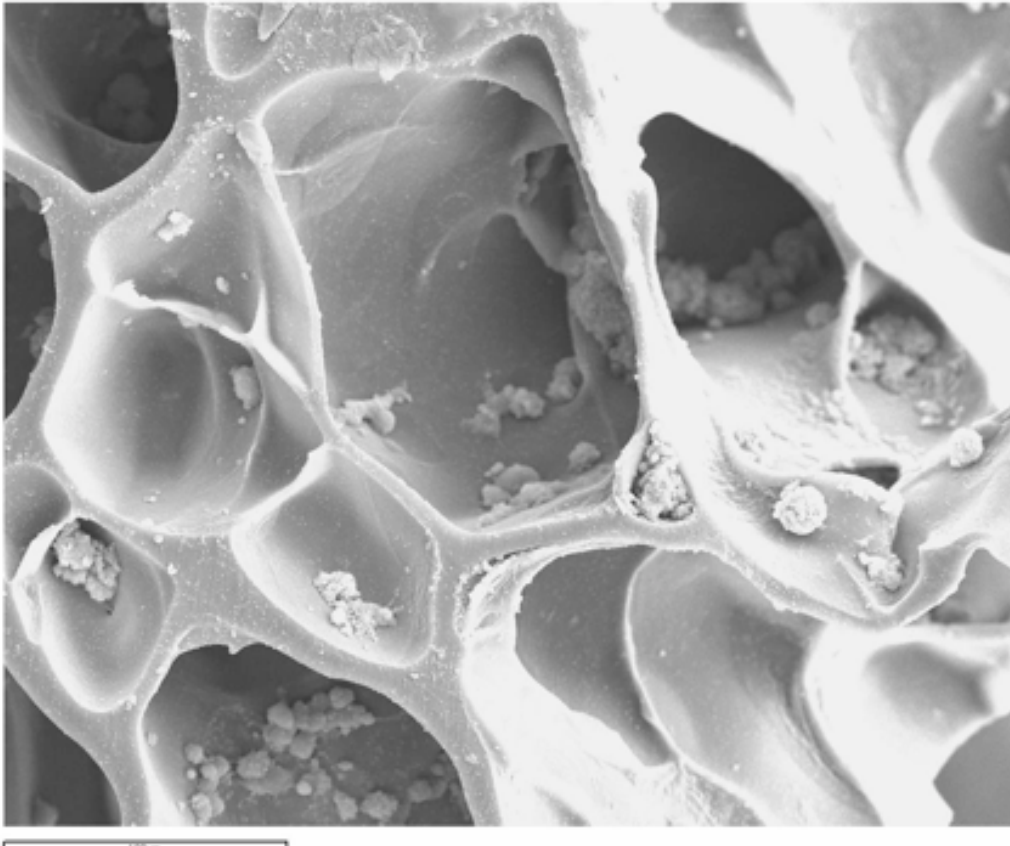


Fig. 20: Imagen de microscopía electrónica de barrido mostrando el tamaño de poro de la matriz o scaffold.

4.6 ELABORACIÓN DEL SOPORTE PARA LA MATRIZ MEDIANTE EL USO DE FOTOPOLÍMEROS

Con el fin de maximizar el grado de unión de la matriz (sola o con cultivo celular) al defecto mandibular y para evitar su migración, así como para garantizar una morfología anatómicamente adecuada en el hueso neoformado, se utilizaron soportes de polímero hechos a medida para sujetar las matrices cilíndricas durante el procedimiento quirúrgico. (Fig. 21)

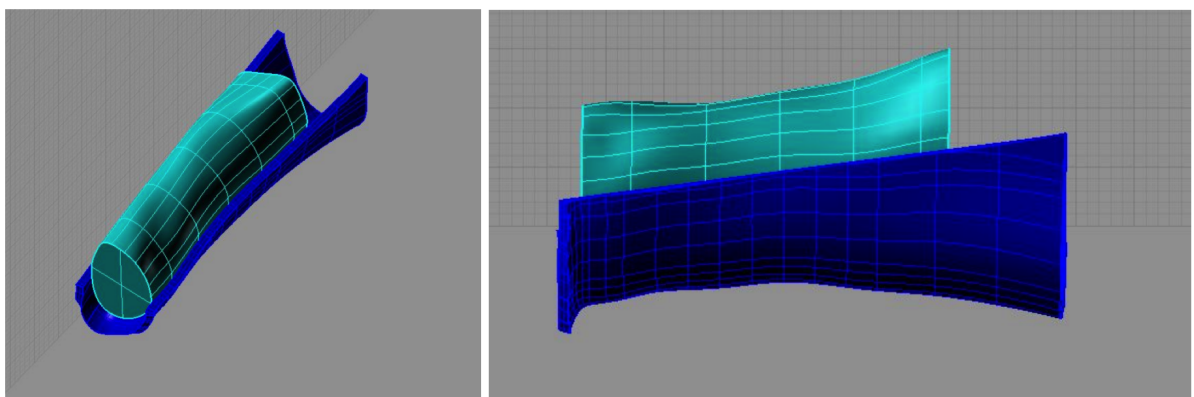


Fig. 21: Diseño mediante CAD-CAM de la camisa de soporte (azul) para el scaffold (verde).

El prototipo de estos soportes fue realizado por la Fundación Prodintec (Parque Científico y Tecnológico, Gijón, Asturias) usando la tecnología CAD/CAM a partir de imágenes de TC de mandíbulas bovinas estándar (Fig. 22), procedentes del matadero con un peso medio de 60kg.

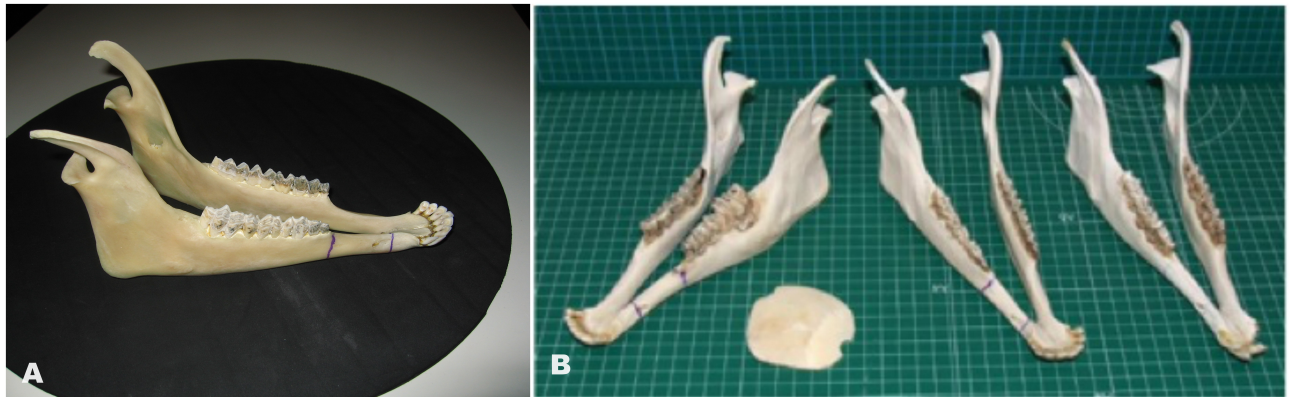


Fig. 22: A: Visión macroscópica de la mandíbula de oveja con la zona correspondiente al defecto segmentario marcada en azul.

B: Imagen del escaneado virtual de tres mandíbulas de oveja y un fragmento de calota.

El material usado para su confección fue FullCure 720®, un fotopolímero acrílico usado ampliamente en la fabricación de prototipos rígidos y aprobado para uso biomédico.

Antes de su utilización como andamiaje de soporte para la matriz y las células diferenciadas en la reparación de los defectos segmentarios de las ovejas, se testó su comportamiento biológico y radiográfico en seis ratas Wistar. Los resultados de esta evaluación, recientemente publicados⁷³ evidenciaron la mayor radiodensidad del FullCure 720®, con respecto al polietileno. (Fig. 23).

Se adquirieron 30 soportes acrílicos, uno para cada oveja y otro de reserva, rígidos y microperforados, de 35 milímetros de longitud con un coste total de 80 euros.

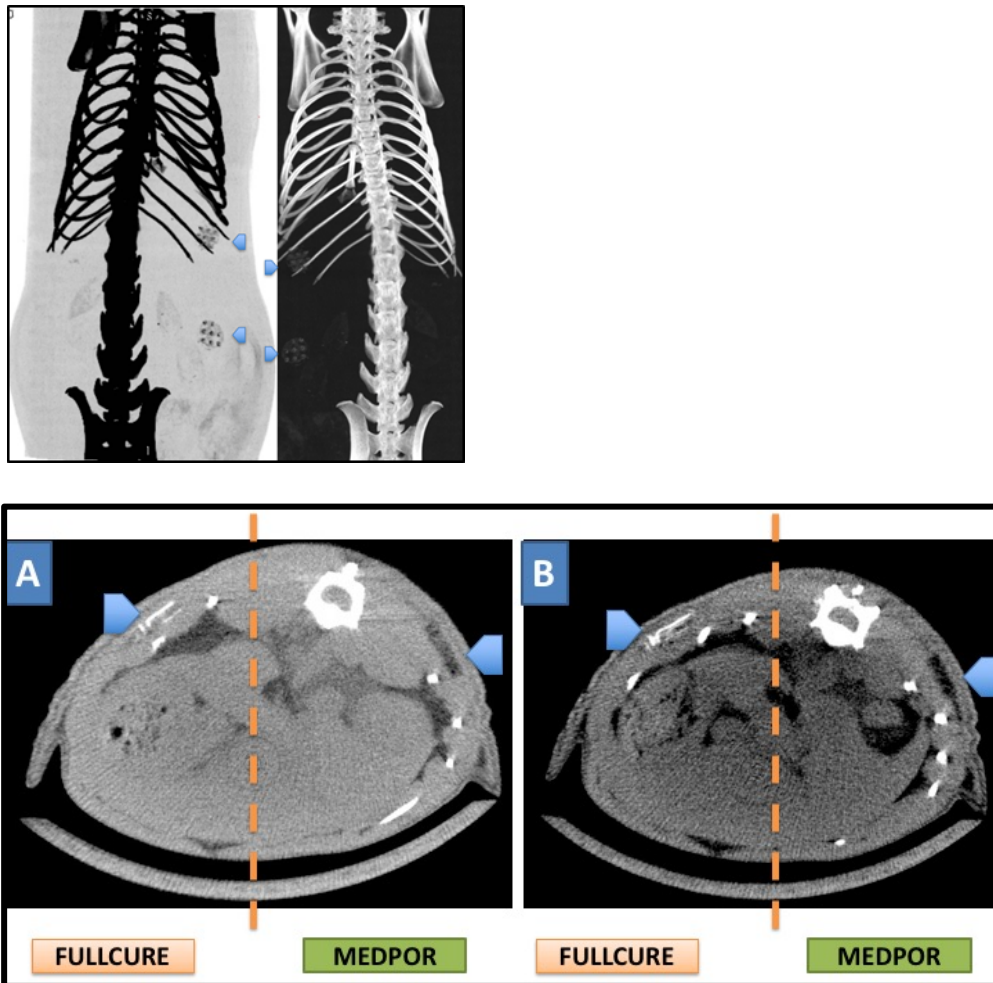


Fig. 23: Comportamiento radiográfico del FullCure 720® en el dorso de las ratas Wistar

4.7 REALIZACIÓN DEL DEFECTO E INJERTO DEL CULTIVO

Todas las cirugías fueron realizadas en condiciones de asepsia y antisepsia.

La sedación y anestesia general se realizó de la manera indicada previamente para la obtención de las células mesenquimales de la cresta iliaca, por uno de los veterinarios del Bioterio de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Oviedo.

Los animales fueron colocados en posición supina y la piel de la región submandibular derecha fue rasurada y lavada con povidona yodada al 10%.

En primer lugar se realizó una cervicotomía transversa, con electrobisturí, a nivel submental para exponer la basal mandibular, procurando no lesionar el nervio mentoniano. (Fig. 24A)

Una vez delimitada la región mandibular y con el fin de mantener el tamaño del defecto y evitar el colapso de los segmentos, se realizó el ajuste de una placa de titanio 2.6 de reconstrucción mandibular (*Orthoconcept S.A., Madrid, España*), asegurada mediante 6 tornillos (3 en la región mesial y 3 en la distal), pasando a realizar la ostectomía de un segmento óseo de 30 mm de longitud, con su correspondiente periostio, utilizando una sierra oscilante y abundante irrigación con suero salino (Fig. 24B).

Se procuró una cuidadosa hemostasia y la zona del defecto fue lavada con suero salino y secada con material absorbente.

Posteriormente se colocó el soporte *Fullcure* en la zona inferior del defecto y fue sujeto a la placa de reconstrucción mediante el uso de tornillos.

El defecto se injertó con la matriz, sembrada con osteoblastos en el grupo experimental y, en cambio, en el grupo control solo se utilizó la matriz de albúmina plasmática de oveja (Fig. 25).

Para finalizar, se suturó la herida en planos mediante sutura reabsorbible Vicryl 2/0 (*Ethicon, Lennecke Marelaan, Bélgica*).

Los animales fueron mantenidos libres en su cercado habitual, con acceso ilimitado a su comida y agua desde el primer día tras la operación.

A las 12 (grupo T12) o 32 semanas (grupo T32), los animales fueron sacrificados mediante la administración de una sobredosis de Pentobarbital sódico 100mg/kg por vía intravenosa.

Se procedió a la sección de las cabezas de todas las ovejas y a su congelación para permitir la conservación y manipulación.

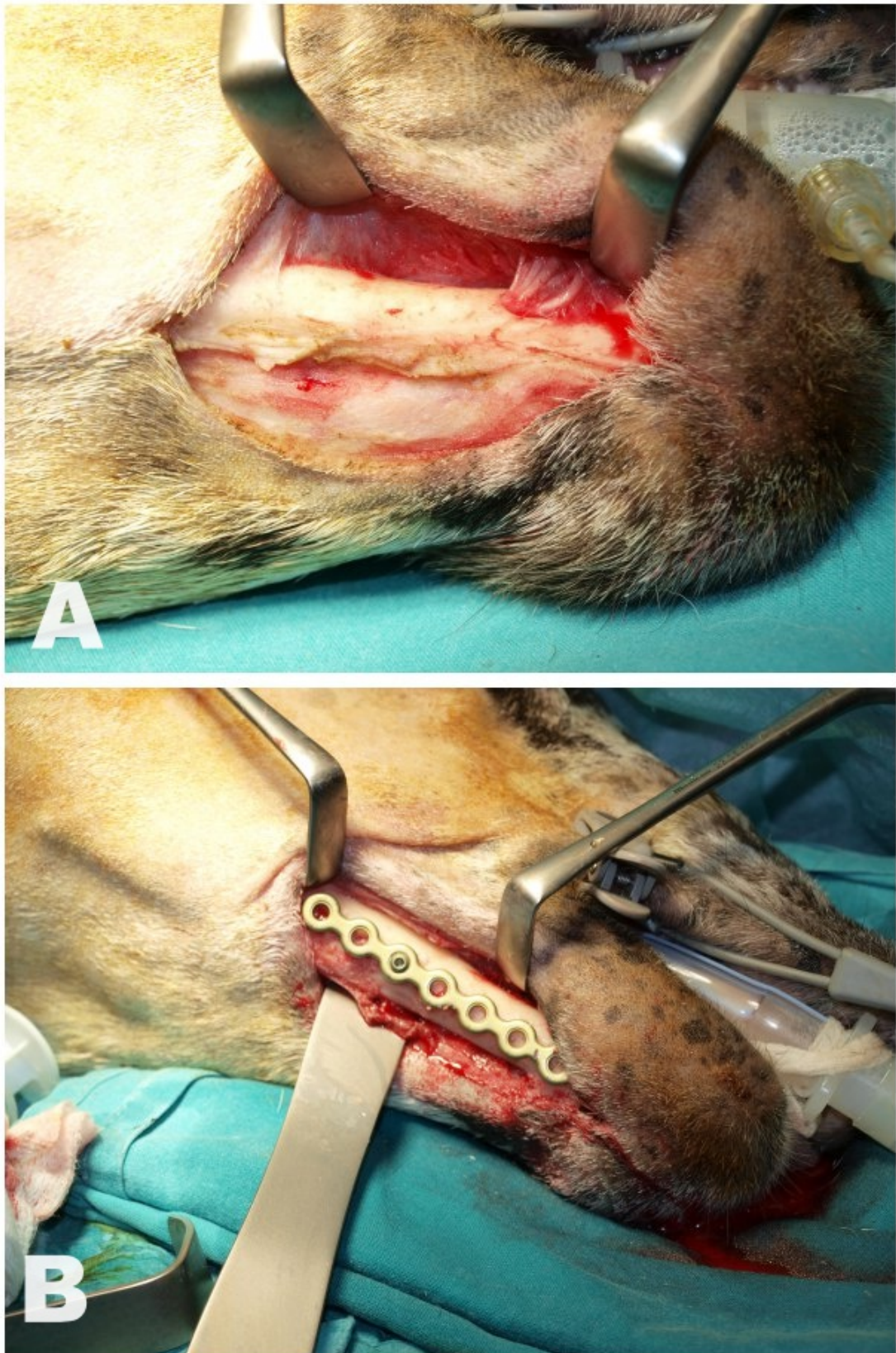


Fig. 24: Imágenes intraoperatorias. A: Cervicotomía transversa y exposición de la basal mandibular, con identificación del nervio mentoniano. B: Adaptación de la placa previamente a realizar la mandibulotomía.

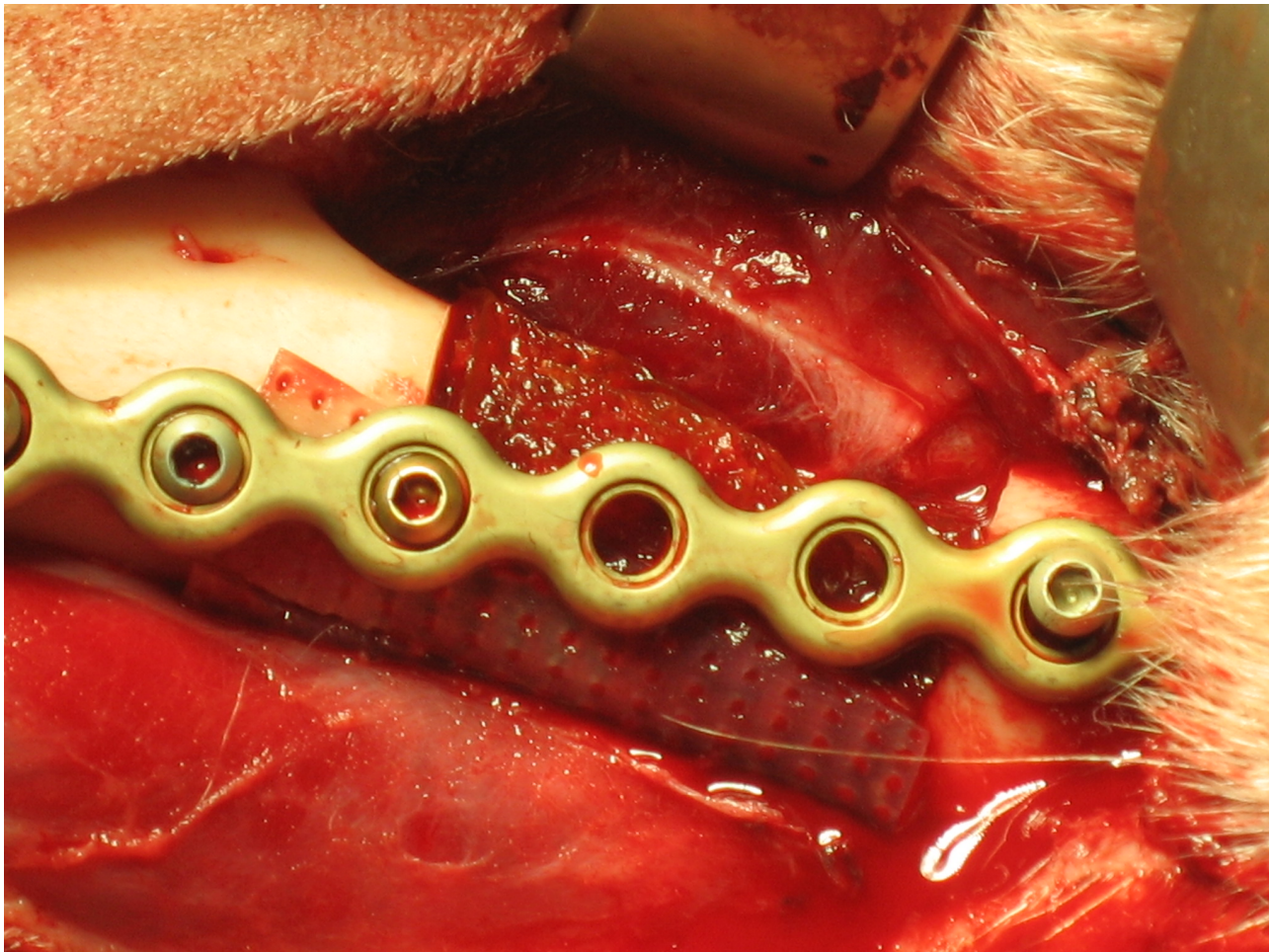


Fig. 25: Imagen intraoperatoria mostrando la colocación definitiva del injerto y su sujeción mediante placas y tornillos de osteosíntesis.

4.8 ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS

4.8.1 ANÁLISIS RADIOLÓGICO CONVENCIONAL Y MEDIANTE MICROTOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA (MICRO-CT)

Se obtuvieron imágenes de cada cabeza mediante tomografía computarizada (*Toshiba Aquilion 16; Toshiba Medical Systems Corporation, Tochigi, Japón*), colocando cada muestra en la mesa del TC con el eje mayor de cada rama mandibular en el plano

axial de la mesa. Se realizó para cada estudio una adquisición volumétrica, empleando unos parámetros de 120kV y 125 mS y un grosor de corte de 0,5mm de espesor, con dosis de radiación modulada, ajustada a la densidad de la muestra.

El procesado de las imágenes DICOM obtenidas se realizó usando el software de imágenes radiológicas OsiriX 64-bit (*Pixmeo, Ginebra, Suiza*) para MacOS. Con este programa se obtuvieron reconstrucciones multiplanares (MPR), proyección en máxima intensidad (MIP) y renderizaciones 3D de volumen.

Para el análisis mediante micro-TC y microscopía electrónica de barrido, se extrajo un segmento óseo de 30 x 10 mm de la región objeto de estudio de cada oveja, tal y como se explicita en la figura 26.

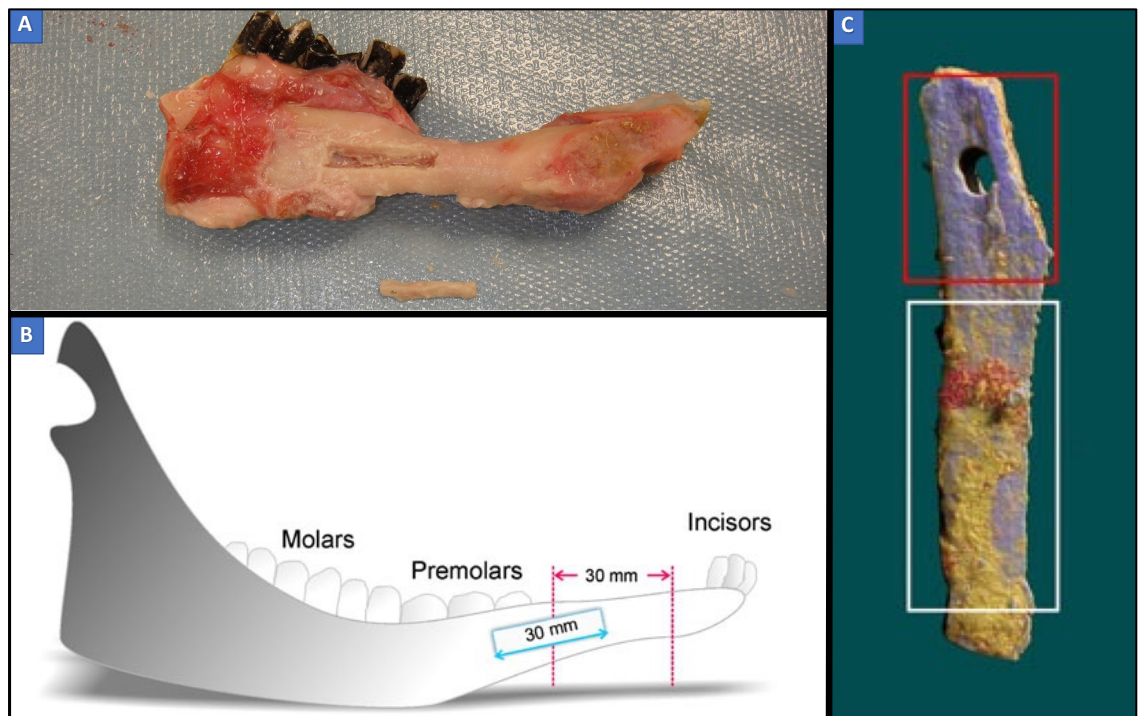


Fig. 26: Esquema representativo del fragmento óseo estudiado. A. Hemimandíbula reconstruida con scaffold del grupo de 32 semanas. B. Esquema de la zona objeto de estudio mediante micro-CT (rectángulo azul). C. Escaneado original de uno de los fragmentos analizados. El orificio superior (rectángulo rojo) representa el hueso nativo de la oveja (hueso residente) mientras que el inferior corresponde al hueso neoformado (rectángulo blanco).

Dichas muestras incluían por tanto hueso nativo mandibular (hueso residente: control) y hueso neoformado. Por ello, se determinaron para el estudio de imagen, dos áreas de interés para cada muestra. Por un lado, la correspondiente al hueso nativo o residente (alrededor de 10 mm) y de otra parte la del hueso neoformado. (10 mm).

Todas las muestras fueron escaneadas usando un sistema de micro-TC de alta resolución (*SkyScan 1174, SkyScan, Kontich, Bélgica*) y se realizó una reconstrucción en 3D mediante el software *NRecon SkyScan*. Las variables estudiadas fueron:

- Densidad mineral ósea (BMD), expresada en gramos de hidroxapatita por centímetro cúbico (g HA/cm³).
 - Volumen óseo/Volumen total (BV/TV), definido como la ratio entre el volumen óseo del segmento y el volumen total de la región de interés, expresado en %.
 - Grosor trabecular (TbTh), expresado en milímetros.
 - Número de trabéculas (TbN), expresado como 1/mm.
 - Separación trabecular (TbSp), expresada en milímetros.
 - Grado de anisotropía (DA).
 - Índice del modelo estructural (SMI).

4.8.2. ANÁLISIS CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Tras el estudio con micro-CT un fragmento óseo (correspondiente a una oveja sacrificada a las 32 semanas injertada con la matriz embebida en células diferenciadas) fue remitida al Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Universidad de Valladolid e interpretadas en el Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo (Prof. JA Vega). La pieza se conservó en paraformaldehído al 4% y pH 7.3 y posteriormente se seccionó en bloques que contenían tanto el material injertado como el hueso nativo o residente de la oveja (Fig. 27). A continuación se cubrieron ambas caras del corte con una capa de carbono para hacer la muestra conductora. Se realizó un análisis del peso atómico mediante detección de electrones retrodispersados. Se utilizó el sistema automático de análisis de imágenes Quantimet 550, Leica, QWIN Program en base a la regleta de calibración de las microfotografías.

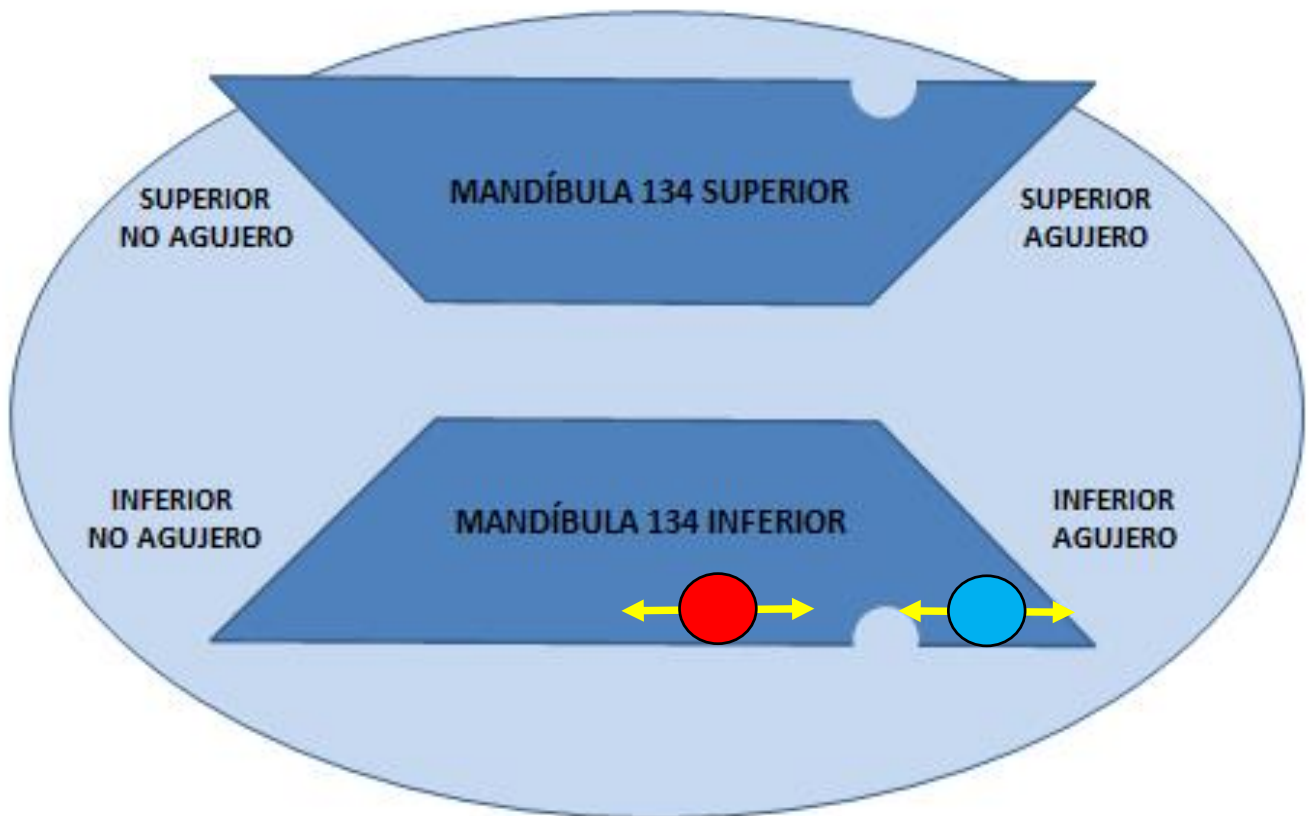


Fig .27 : Esquema representativo que ilustra el proceso de obtención y preparación de las muestras para el estudio con microscopía electrónica de barrido

4.8.3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Tras el análisis radiológico mediante TC convencional, las mandíbulas fueron extraídas y los restos de tejidos blandos adheridos fueron eliminados.

Se tomaron secciones transversales de unos 2-3 mm de grosor de las regiones anterior, central y posterior del hueso neoformado y se decalcificaron en formaldehído al 10% tamponado y suplementado con ácido nítrico al 0,7% durante 4-7 días.

Una vez decalcificadas, dichas secciones fueron lavadas con agua destilada, rehidratadas en una serie de diluciones graduales de etanol e incluidas en parafina.

Cada muestra fue dividida en secciones de 7-10 μm de grosor usando un micrótopo HM 350 S (Microm, Waldof, Alemania) y dichas secciones teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) o tricrómico de Masson y analizadas en profundidad.

4.8.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado utilizando el software SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, USA, 1989-2006). Los parámetros cuantitativos del análisis mediante micro-TC están expresados como media aritmética \pm desviación estándar salvo que se indique lo contrario.

Para comprobar el ajuste a la normalidad de los valores de las variables obtenidas con el micro-CT, se utilizaron dos *tests*. Según la prueba de Kolmogorov-Smirnov todas las variables se ajustaban a una distribución normal. Según la prueba de Shapiro-Wilk, la distribución no se puede considerar normal en todos los casos.

Para comparar los valores obtenidos en el hueso neoformado (N) de cada oveja con el control de hueso “sano” del mismo animal (R), se utilizó la prueba T pareada o la prueba de Wilcoxon. Para comparar los resultados obtenidos a las 32 semanas con los obtenidos a las 12 semanas así como las posibles diferencias entre el las ovejas experimentales y las ovejas control, se utilizó la prueba t de Student creando una variable relativa en cada individuo tomando como referencia el hueso nativo (residente). Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando la $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 CULTIVOS CELULARES IN VITRO

5.1.1 CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

En nuestro estudio, ninguna de las muestras de fragmentos óseos obtenida a partir del hueso (maxilar o mandibular) por vía oral o extraoral de las ovejas (grupo experimental) nos permitió un crecimiento celular. La mayoría de los casos por contaminación fúngica, pese a la presencia de antibióticos en el medio de transporte y de cultivo.

Por el contrario, todos los cultivos realizados a partir de las células mesenquimales obtenidas por punción de la médula ósea mostraron un adecuado crecimiento y adhesión a la superficie plástica del recipiente. Con la metodología descrita en el material y método, se obtuvieron entre 8-10 frascos de cultivo de 150 cm² con confluencia celular, con aproximadamente 25-30x10⁶ células para su ulterior diferenciación en un tiempo medio de 4 semanas.

En el microscopio invertido de contraste de fases, estas células tenían el típico aspecto pseudofibroblástico de las células madre mesenquimales con un citoplasma irregular con numerosas prolongaciones (Fig. 28).

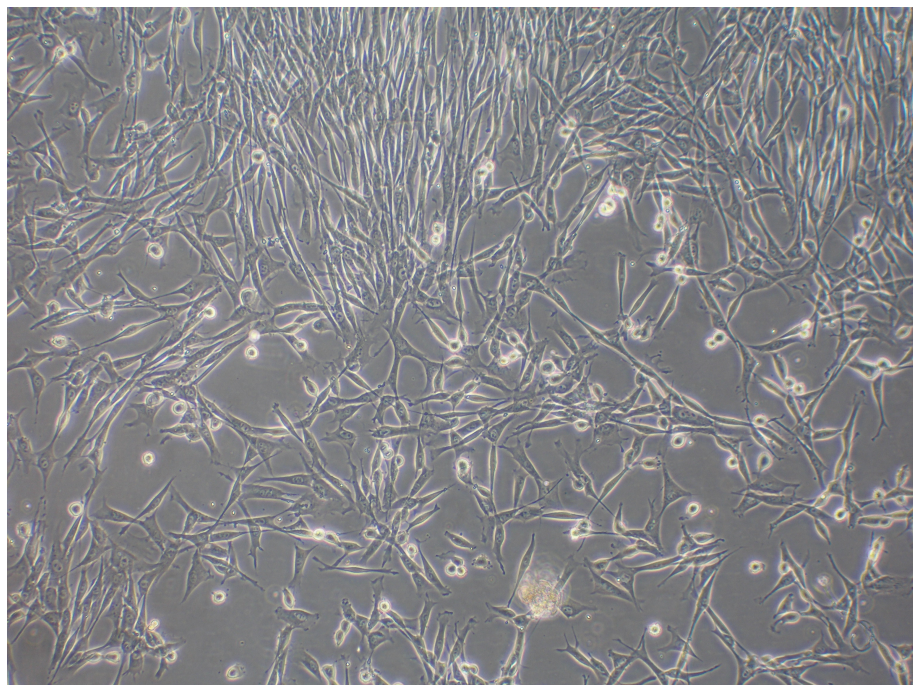


Fig. 28: Morfología de las células madre cultivadas in vitro en el cuarto pase al microscopio invertido.

Aunque sólo se realizó el estudio citométrico de una de las muestras, el fenotipo de las células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea de oveja parece tener similitud con el de las células de origen humano: positivo para CD44, CD105 y CD90. Los marcadores para CD34 y CD45 fueron negativos. No obstante, estos resultados deben interpretarse con precaución puesto que la falta de inmunomarcaje puede deberse a la predominante utilización de anticuerpos humanos en nuestro estudio.

5.1.2 DIFERENCIACIÓN EN LA MATRIZ DE ALBÚMINA

Para su utilización en las ovejas del grupo experimental, las células cultivadas in vitro, fueron sembradas sobre la matriz durante 3 semanas incorporando medio de cultivo osteogénico (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*).

La estructura de la matriz proteica bajo el Microscopio Electrónico de Barrido ya había sido descrita en trabajos previos^{86 87 88}, cuando su origen procedía del plasma humano. La principal diferencia del presente estudio es la utilización de la sangre de la oveja. Con el MEB no observamos diferencias importantes entre la matriz de origen humano y la de origen animal. Tal vez el tamaño del poro en las matrices derivadas de la sangre de la oveja parece superior al observado en los soportes derivados del plasma humano. En general, la estructura presentaba poros de tamaño irregular y disposición en capas superpuestas. Prácticamente todos los poros estaban interconectados (Fig. 29).

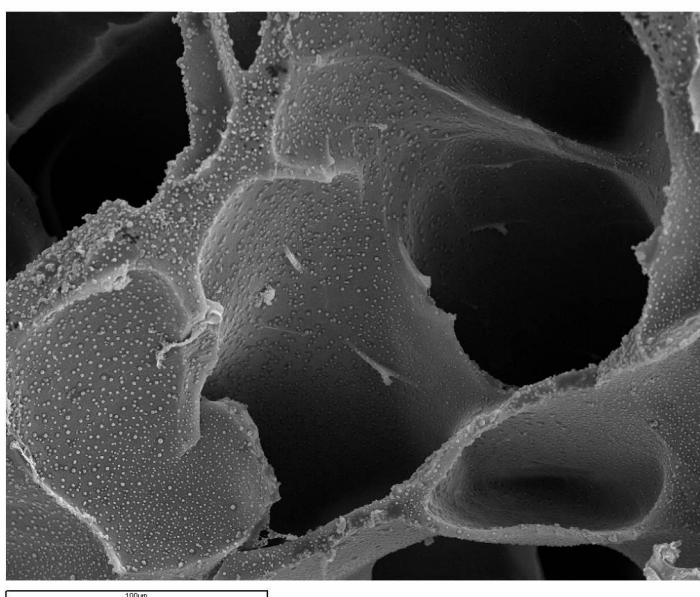


Fig. 29: Superficie del soporte mediante el MEB a escala de 100 μm .

A las tres semanas del cultivo las células se adherían de manera mayoritaria a los poros de la matriz, interconectándose entre sí como se evidencia en la figura 30 de MEB.

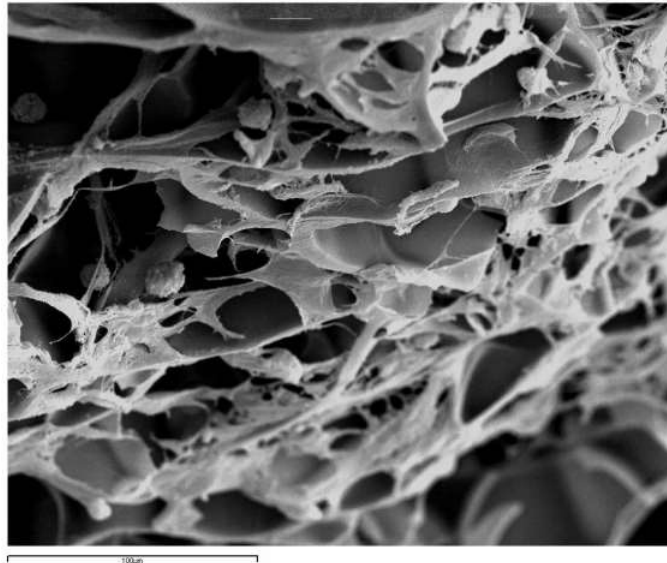


Fig. 30: Imagen de MEB de la matriz sembrada con células en fase de diferenciación. Escala 100 μm .

En el presente trabajo, no se realizaron estudios con fosfatasa alcalina y/o tinción de Von Kossa para identificar la diferenciación osteoblástica de las células cultivadas, al asumir los resultados previos de otros trabajos del grupo investigador^{78 86 87}

5.2 CAMISA DE FULLCURE® Y MATRIZ PROTEICA

La camisa de Fullcure® empleada en el presente estudio contribuyó a la estabilización y soporte de la matriz proteica a la placa de titanio, pero no aportó una significativa ayuda en la correcta morfología del hueso neoforado (Fig. 31)⁷⁴

Con la metodología CAD-CAM descrita previamente pudimos alcanzar el objetivo de que el scaffold proteico se adaptara adecuadamente a la mayor parte de los defectos segmentarios practicados en el cuerpo mandibular de las ovejas, aunque no en todos los animales con la misma precisión (Fig. 32).

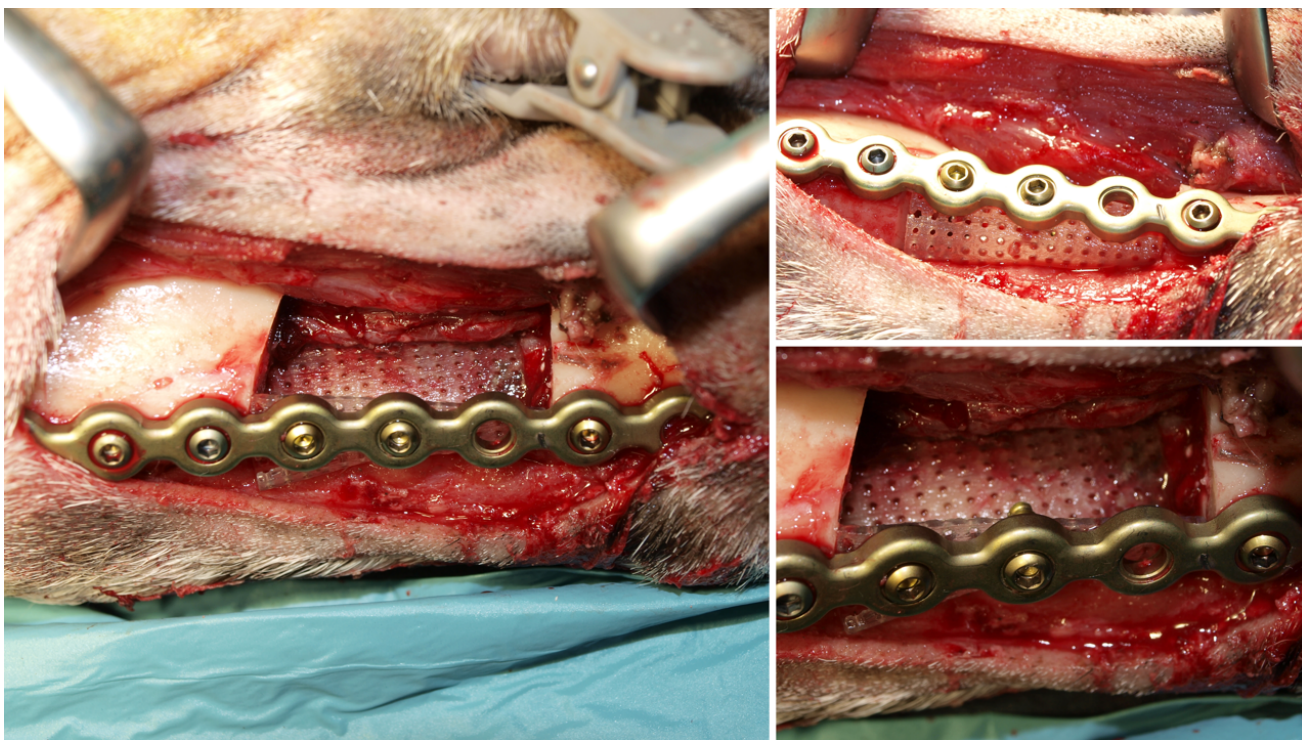


Fig. 31. Visión caudal de la camisa de Fullcure en el defecto segmentario previa colocación de la matriz acelular. (Tomado de Megias J ⁸⁴).

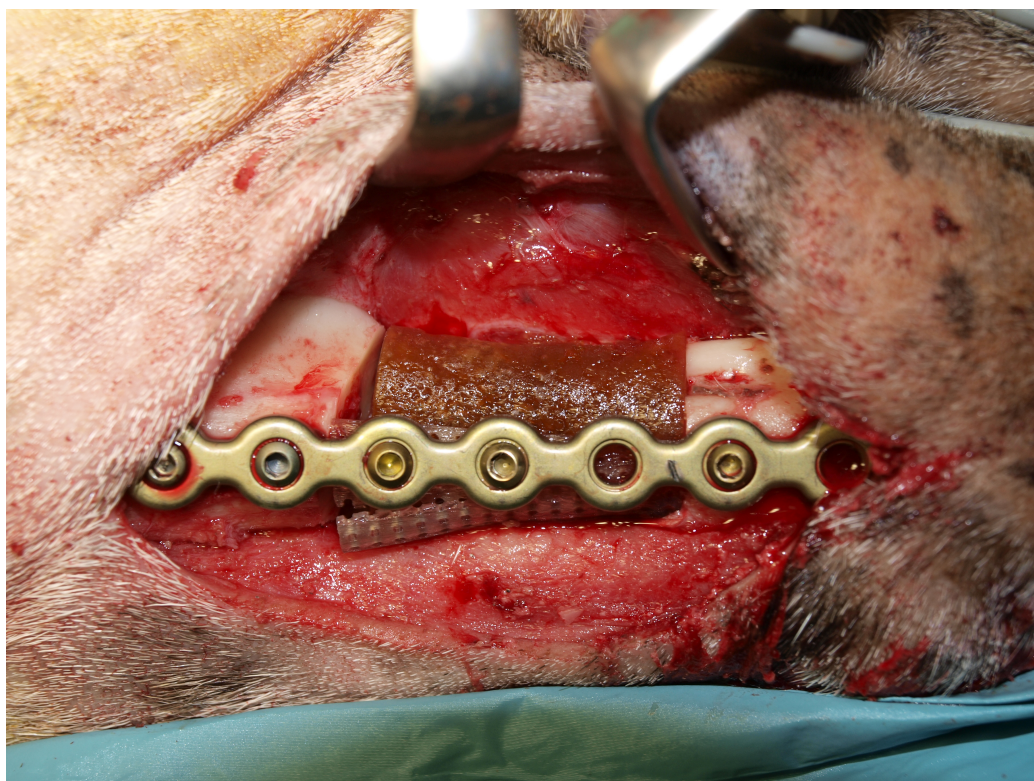


Fig. 32. Insuficiente contacto mandíbula-matriz en una oveja del grupo control debido a la angulación de la osteotomía distal.

5.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. RESULTADOS CLÍNICOS Y MACROSCÓPICOS

5.3.1 GRUPO CONTROL

Las cinco ovejas injertadas con la matriz sin células (grupo control), sobrevivieron a la cirugía, mostrando durante el postoperatorio inmediato y tardío un patrón de alimentación y comportamiento sin incidencias. Tras su estudio de imagen y antes de preceder al estudio histológico se realizó una valoración macroscópica del área intervenida. En una de las ovejas sacrificadas a las 12 semanas del injerto (T12) no se apreció ninguna regeneración (Fig. 33), mientras que en la otra del mismo tiempo de sacrificio, se apreció una osificación subtotal. En las ovejas que sufrieron la eutanasia a las 32 semanas (T32), se comprobó manualmente una consolidación ósea completa en dos de ellas tras la retirada de la placa de reconstrucción, mientras que en la restante la osificación fue subtotal. Llamativamente, la neoformación ósea en una de las ovejas con consolidación total del grupo T32 evidenció una importante asimetría, respecto al lado no intervenido (Fig. 34)



Fig. 33: Espécimen de oveja control (grupo: 12 semanas de sacrificio) sin formación ósea

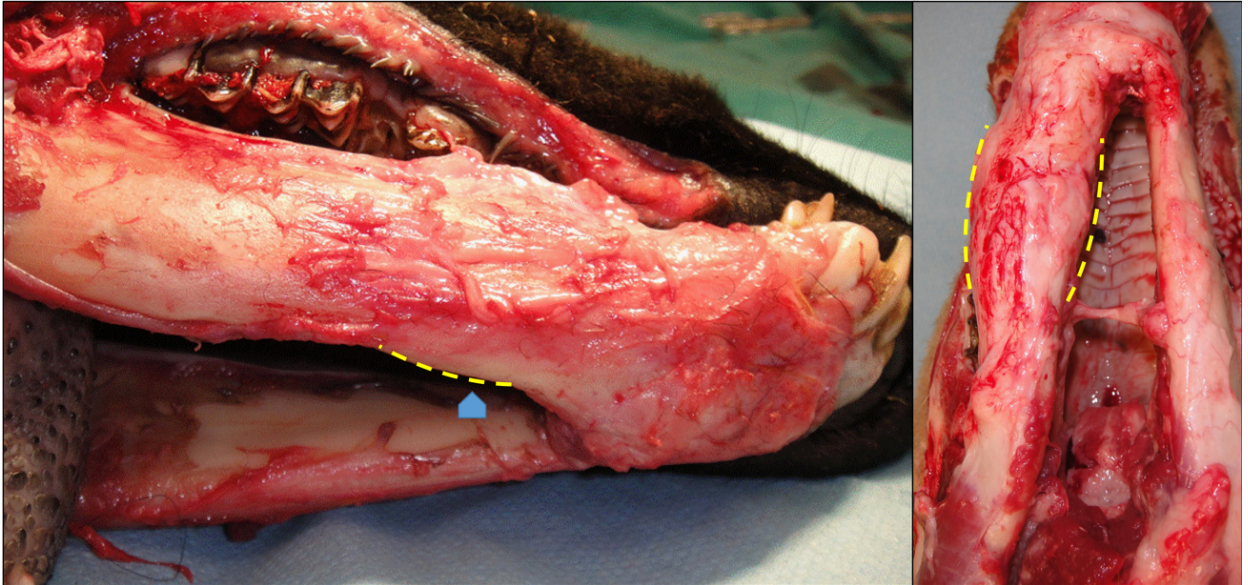


Fig. 34. Aspecto macroscópico de la reparación completa pero asimétrica de una oveja control sacrificada a las 32 semanas (Megias, J. ⁸⁴)

5.3.2. GRUPO EXPERIMENTAL

De las 10 ovejas injertadas con células y matriz proteica, dos fallecieron por causas desconocidas, al no realizarse autopsia. Una de ellas pertenecía al grupo de sacrificio de las 12 semanas (exitus a los dos días de la cirugía) y otra pertenecía al grupo de sacrificio a las 32 semanas (exitus al mes de la cirugía). En ningún de los dos animales se recuperaron las mandíbulas. Curiosamente y a pesar de romper la homogeneidad del estudio en la oveja correspondiente al grupo de sacrificio a las 12 semanas que falleció precozmente a la cirugía, se le habían aplicado dos placas de reconstrucción, único ejemplar del estudio al que se le realizó este procedimiento. (Fig. 35). En resumen el grupo experimental quedó configurado por 4 ovejas sacrificadas a las 12 semanas del injerto y otras 4 sacrificadas a las 32 semanas.

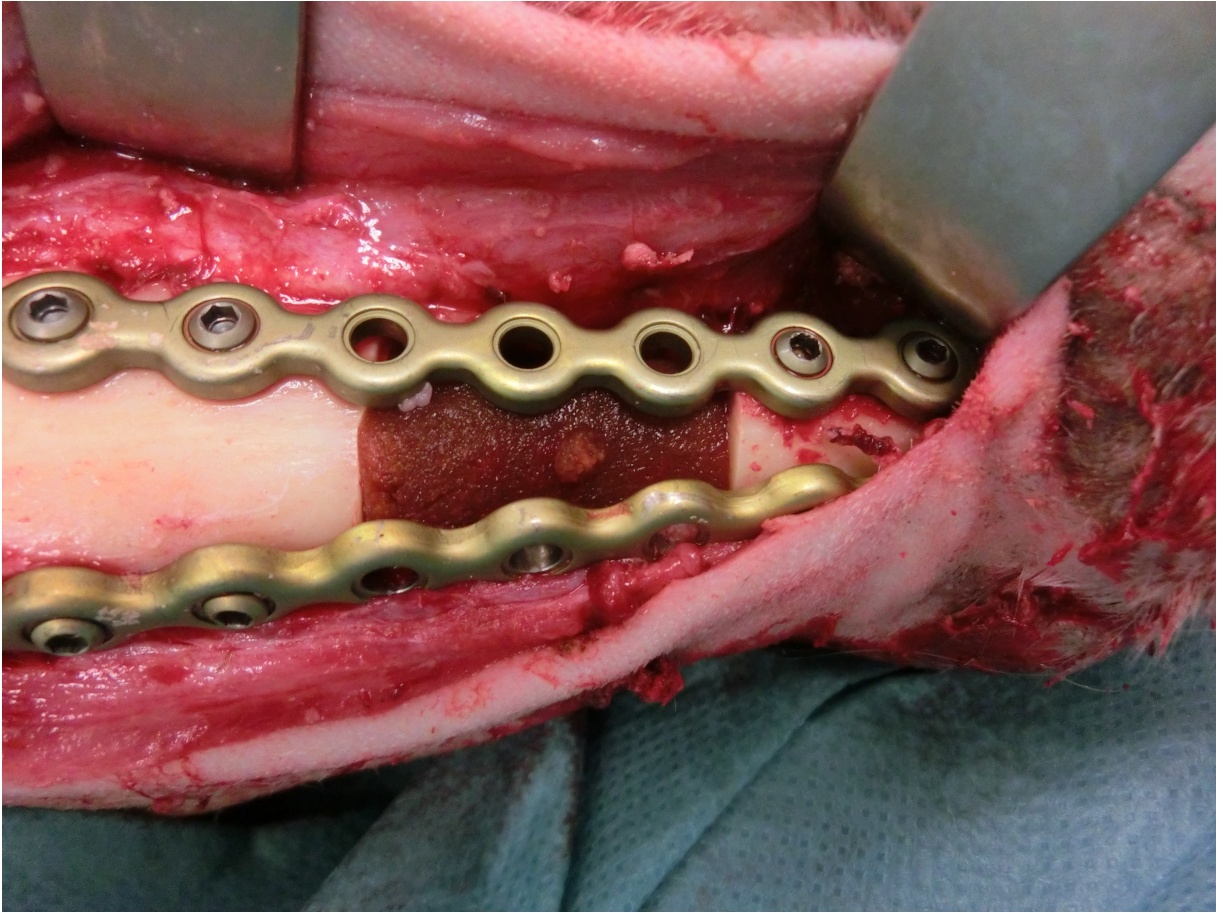


Fig. 35. Imagen intraoperatoria de la única oveja (Grupo 12 semanas de sacrificio) a la que se aplicaron dos placas de reconstrucción. Este animal falleció a las 48 horas de la cirugía.

Macroscópicamente en las ovejas con sacrificio precoz (T12) se observó formación ósea en los extremos de la ostectomía en tres ejemplares y ausencia completa de formación ósea en un ejemplar. En las ovejas experimentales de sacrificio tardío (T32) se pudo observar una reparación completa del defecto en tres animales, mientras que en uno no observamos formación ósea (Figs. 36 y 37).

En al menos cuatro animales (de ambos grupos control y experimental) se objetivó la movilidad en los tornillos de osteosíntesis, con independencia del tiempo de sacrificio.

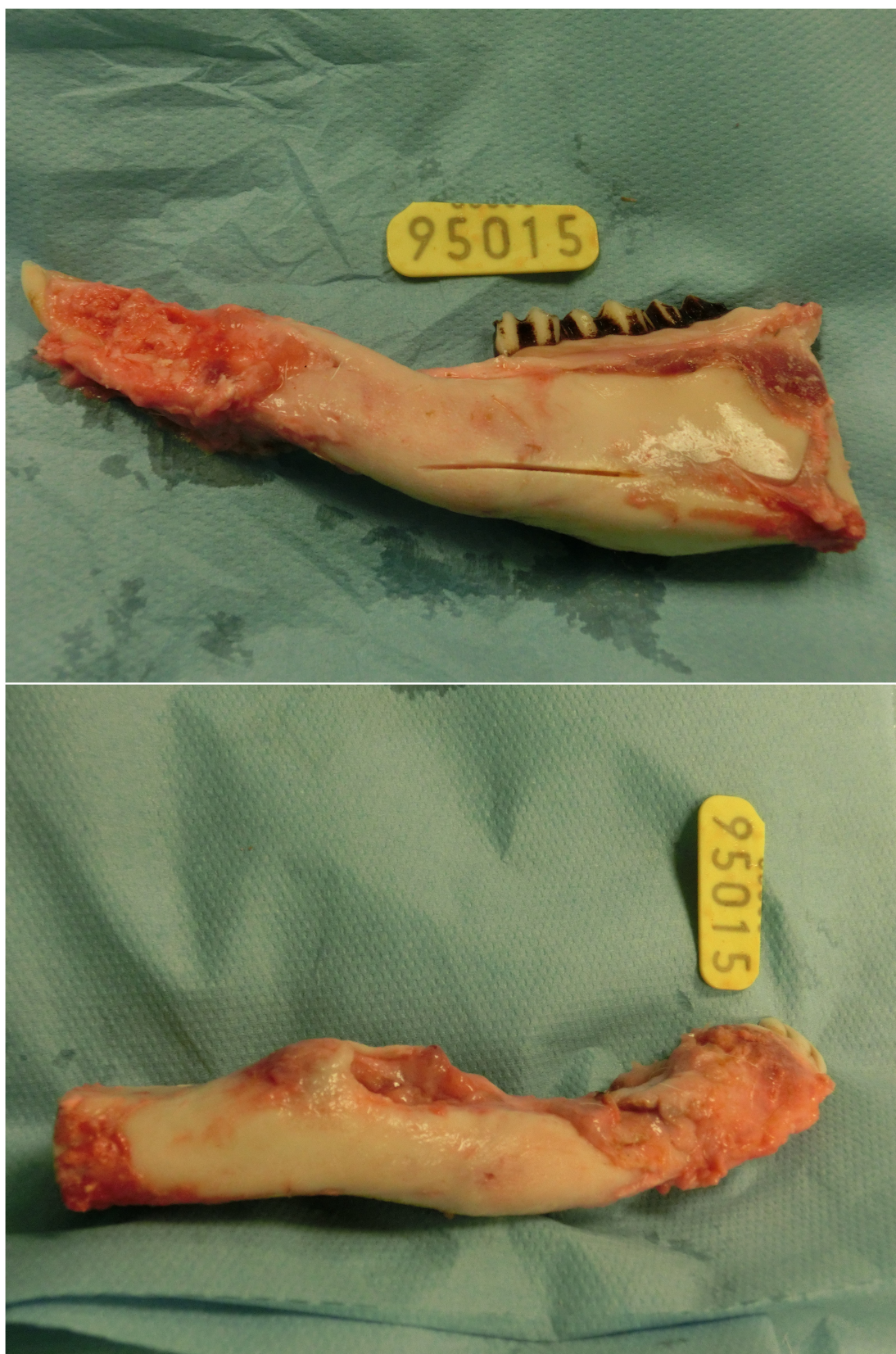


Fig. 36. Espécimen de oveja experimental (T32) con reparación completa del defecto segmentario

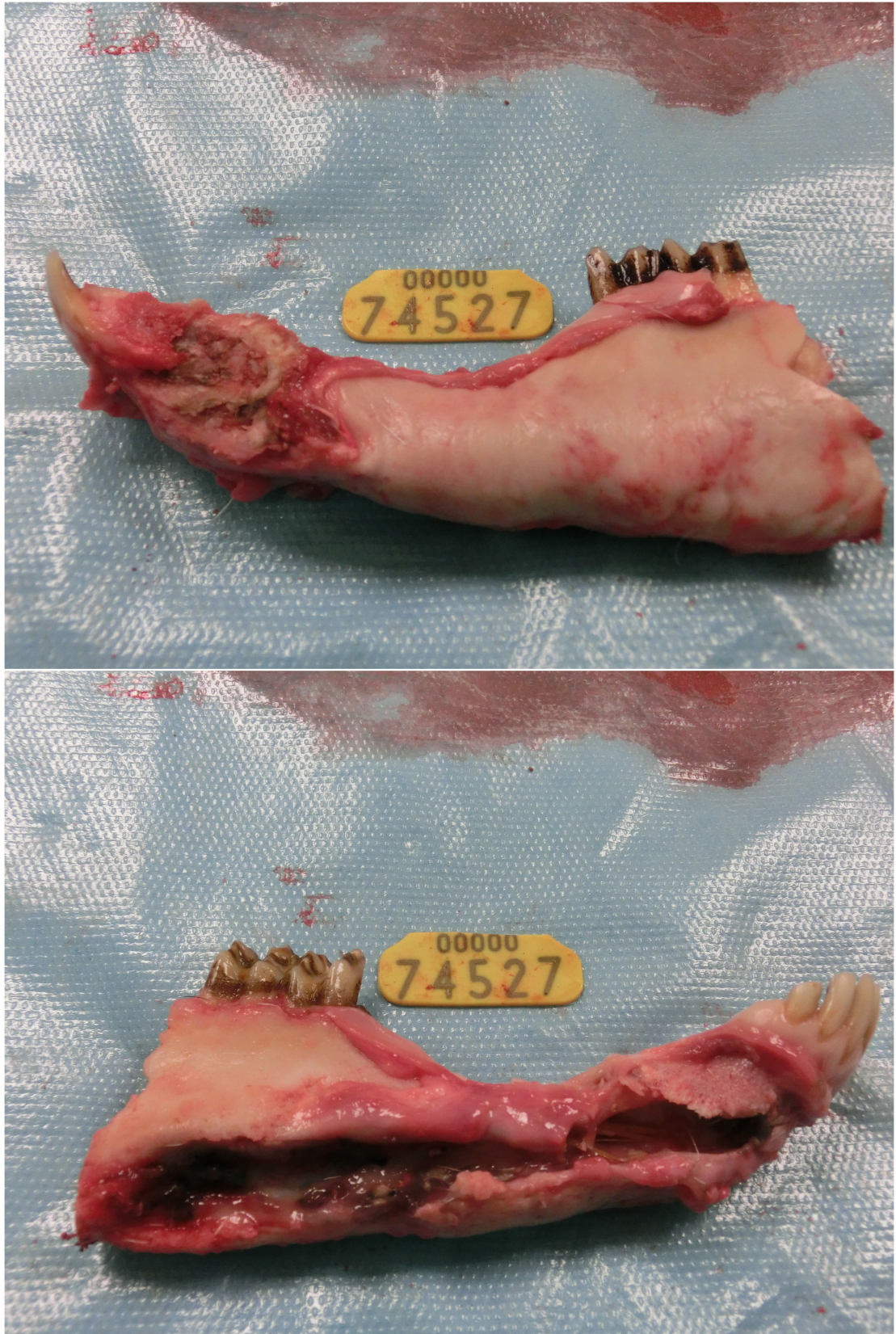


Fig. 37: Aspecto macroscópico de la mandíbula de una oveja del grupo experimental (T32) con formación ósea completa.

5.4 ANÁLISIS RADIOLÓGICO CONVENCIONAL MEDIANTE TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

Tras el sacrificio de los animales, se adquirieron imágenes de TC y se revisaron tridimensionalmente para el análisis del posible proceso reparativo, cualitativo y cuantitativo.

5.4.1 ANIMALES SACRIFICADOS A LAS 12 SEMANAS DEL INJERTO

- **Grupo control**

De las dos ovejas de este grupo sacrificadas a las 12 semanas no observamos radiográficamente formación ósea en un ejemplar y presencia de osteoformación en los extremos de la ostectomía y por la vertiente lingual del defecto en el otro animal (Fig. 38).

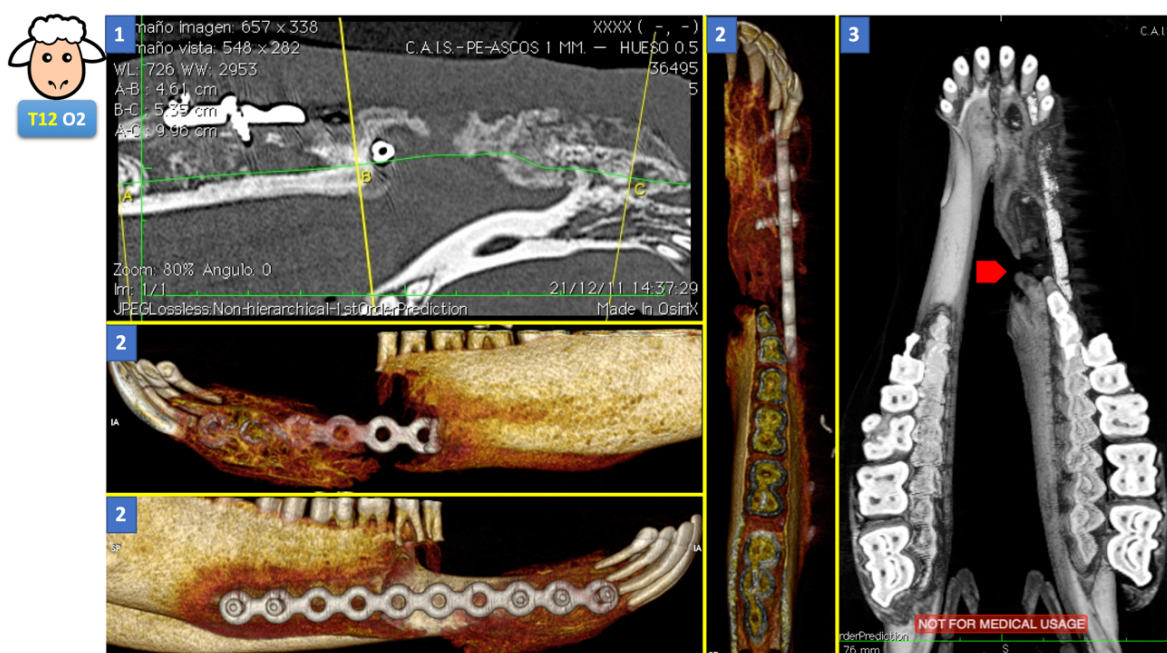


Fig. 38. Incompleta osteoformación en un animal injertado con la matriz sin células y sacrificado a las 12 semanas de la cirugía (Cortesía de Megías J).

- **Grupo experimental**

De las cuatro ovejas de este grupo (matriz con células diferenciadas) sólo en un animal se evidenció radiográficamente una reparación completa del defecto, aunque generando una asimetría en el contorno mandibular (Fig. 39).



Fig. 39: Reconstrucción radiológica tridimensional donde se aprecia la restitución ósea completa

En otras dos ovejas se obtuvo una reparación incompleta del defecto mostrando las imágenes de la tomografía computarizada la falta de neoformación ósea en la parte central del defecto (Fig. 40). En la última oveja de este grupo no se constató formación de callo óseo.



Fig. 40: Reconstrucción tridimensional donde se aprecia la formación ósea únicamente en los laterales del defecto

5.4.2. ANIMALES SACRIFICADOS A LAS 32 SEMANAS DEL INJERTO

- **Grupo control**

En la primera oveja de este grupo se evidenció, en los estudios de imagen, una osificación que unió los dos extremos de las osteotomías, salvando el defecto, a pesar que en algunas áreas de la zona regenerada se apreciaban discontinuidades (Fig. 41).

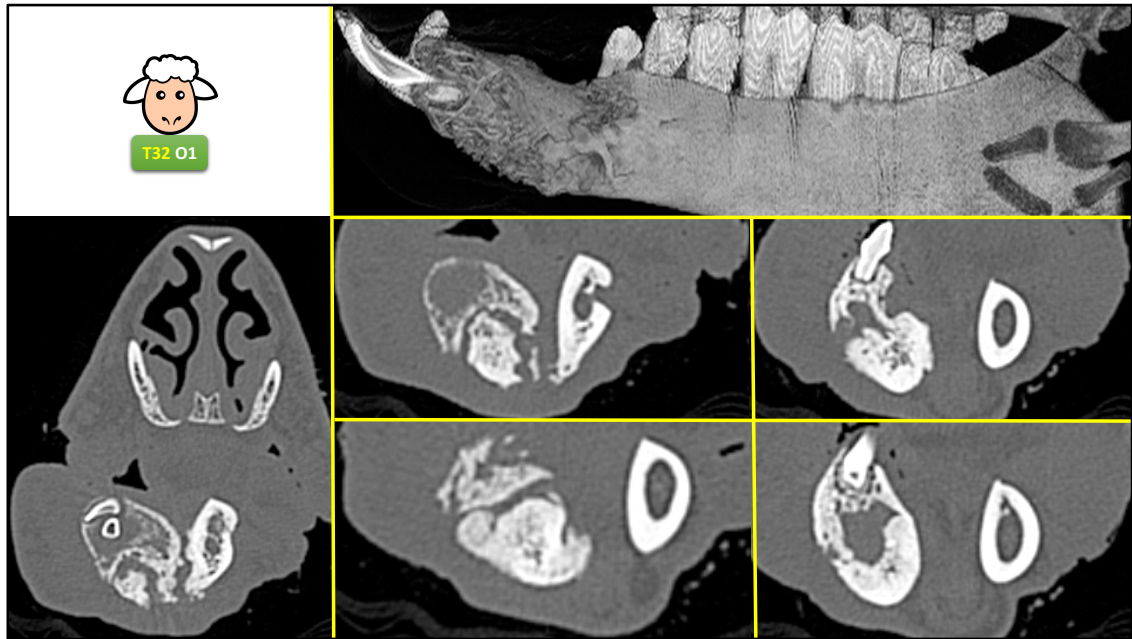


Fig. 41 Imágenes correspondientes a una oveja del grupo control que muestran una reparación completa del defecto pero con importantes áreas radiolúcidas (Cortesía de Megías J).

En la segunda oveja de este grupo las imágenes mostraron una apropiada formación ósea por la vertiente lingual del defecto, pero muy insuficiente por la vertiente vestibular del mismo, presumiblemente relacionable con problemas con la placa de reconstrucción y/o los tornillos de osteosíntesis (Fig. 42).

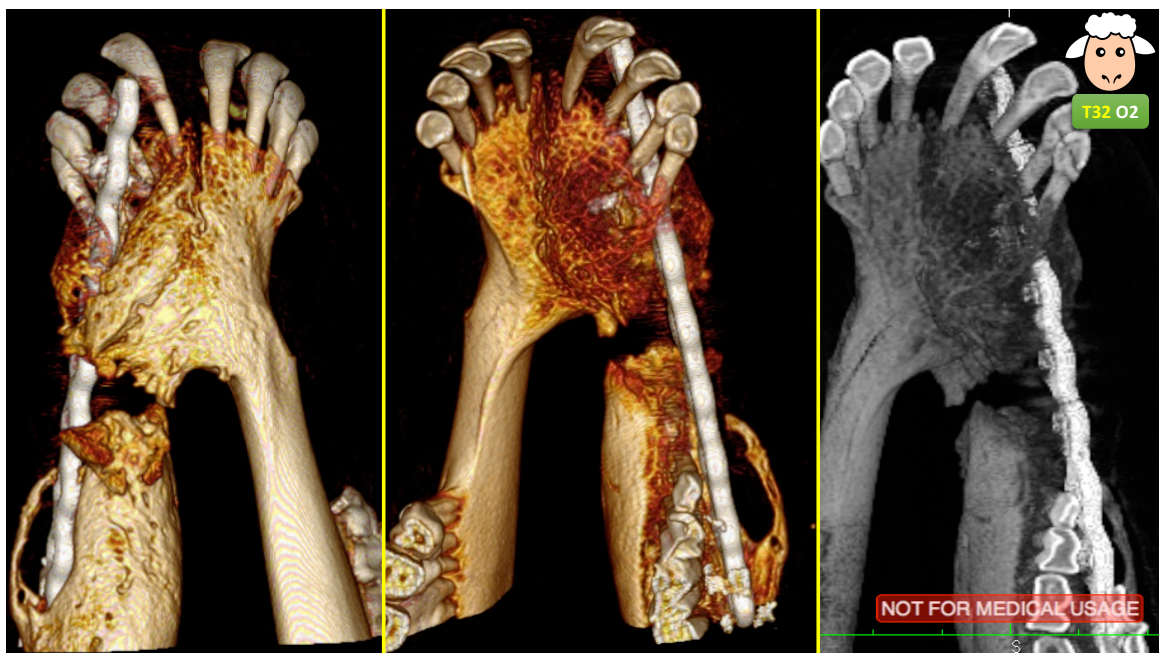


Fig. 42 Imágenes correspondientes a una oveja del grupo experimental sacrificada a las 32 semanas con apropiada formación ósea por la superficie lingual, pero insuficiente por la superficie vestibular (Cortesía de Megías J).

Finalmente, en la tercera oveja de este grupo se evidenció una osificación completa sin defectos lacunares y con mayor radiodensidad, que la observada en las ovejas del grupo control sacrificadas a las 12 semanas del injerto. Se apreció una evidente neoformación ósea en la vertiente lingual del área ostectomizada (Fig. 43). Esta asimetría en el proceso reparativo pudiera deberse a un mal ajuste de la placa de reconstrucción.

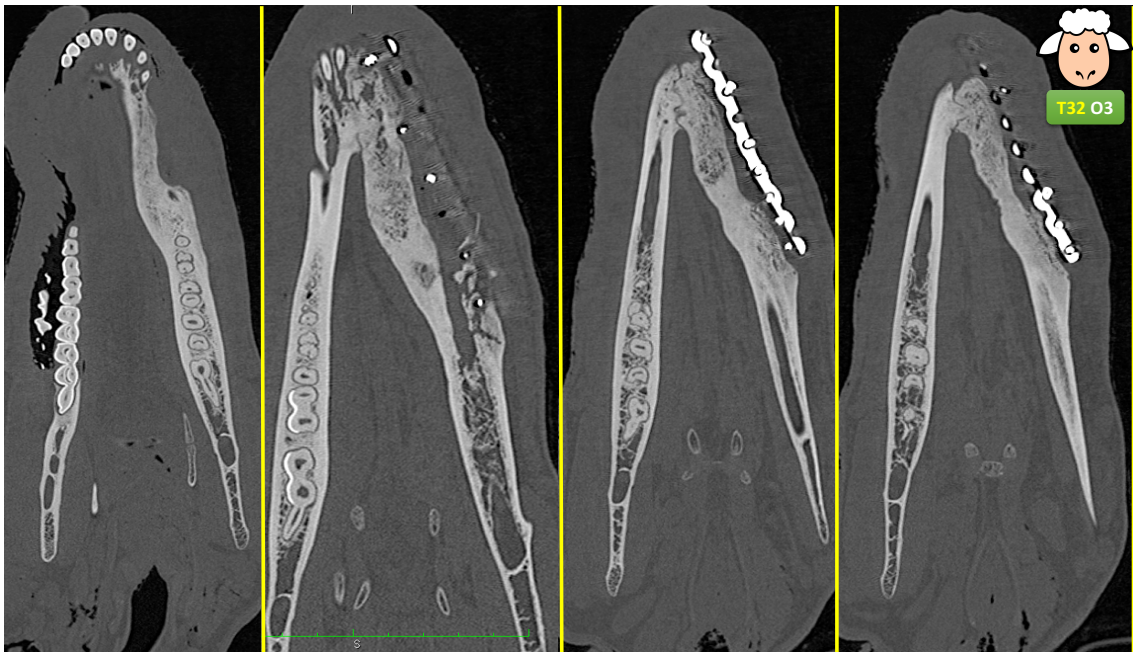


Fig. 43: Imagen de una oveja del grupo control sacrificada a las 32 semanas con formación ósea estable del defecto (Cortesía de Megías J).

- **Grupo experimental**

Tres de las cuatro ovejas de este grupo mostraron una reparación completa del defecto segmentario mandibular con la presencia de hueso, notoriamente mas radiodenso que el observado en los animales del grupo experimental sacrificados a las 12 semanas y los del grupo control pertenecientes a las 32 semanas del sacrificio (Figs. 44 y 45). Sin embargo en una oveja de este mismo grupo no se observó formación ósea, presumiblemente justificable por problemas infecciosos en el área de la cirugía.

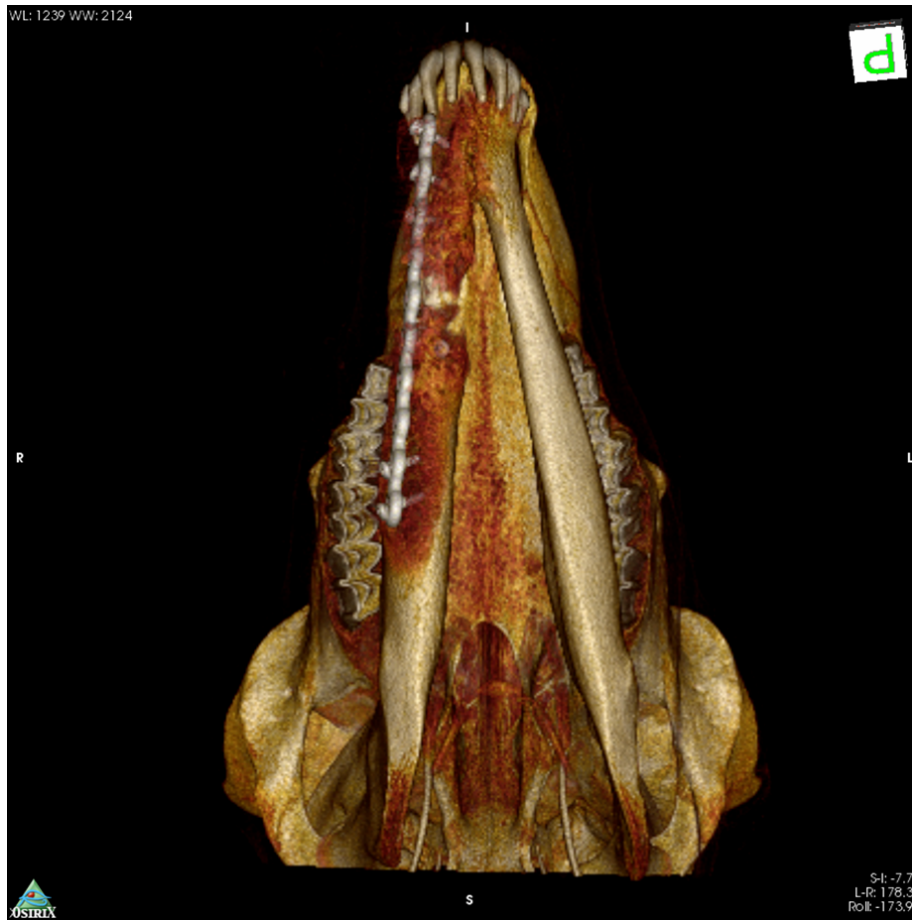


Fig. 44: Formación ósea completa en una oveja del grupo experimental tras 32 semanas

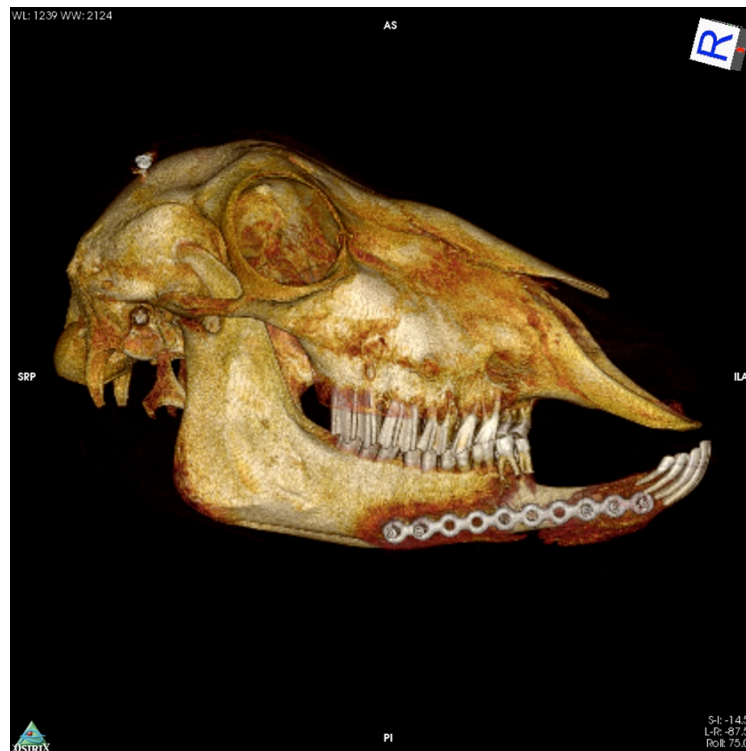


Fig. 45: Visión lateral del espécimen anterior.

En la figura 46, se esquematiza el comportamiento radiográfico de todas las ovejas del presente trabajo. Brevemente al comparar el grado de regeneración entre el grupo control y el experimental, observamos que, la variable tiempo de injerto, juega un papel importante en la restauración de los defectos. De otra parte, la presencia de células diferenciadas en el constructo conduce a una regeneración cuantitativa y cualitativamente mejor.

En algunas ovejas del grupo control se observó que con sólo la presencia de la matriz puede alcanzarse una reparación del defecto, pero con hueso menos radiodenso y siguiendo un proceso reparador que avanza desde los bordes de las ostectomías hacia el centro del defecto. Este proceso parece ser más intenso por la superficie lingual del defecto.

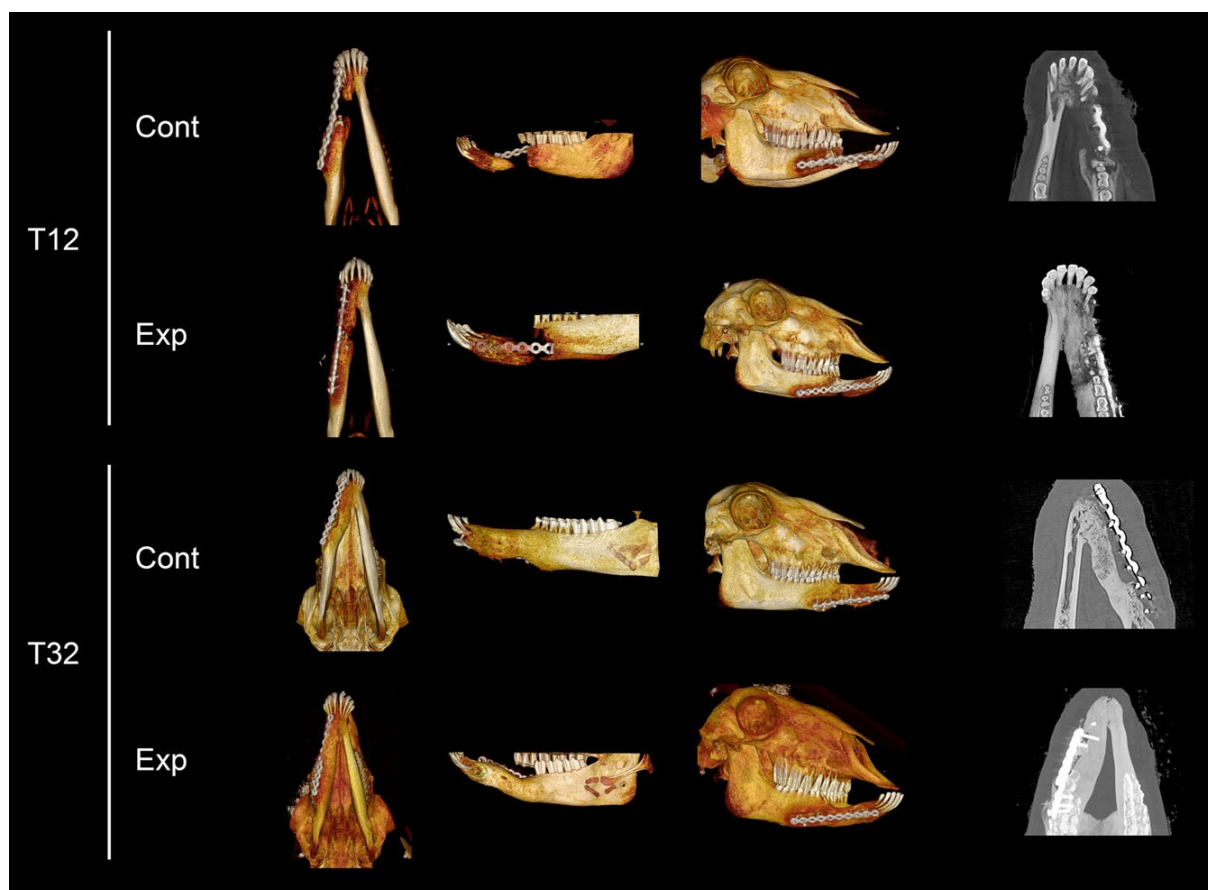


Fig. 46: Esquema simplificado del proceso reparativo observado en las ovejas del presente estudio en función del tiempo de injerto y del material aplicado.

5.5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS MEDIANTE MICRO-TC

Para cuantificar y comparar la calidad del hueso regenerado, se realizó un análisis mediante micro-TC tanto en el grupo Control como en el Experimental (Fig. 47).

Se evaluó:

1. la existencia de diferencias entre el hueso nativo (residente. R) y el neoformado (N) en cada oveja, tanto en todos los animales del estudio, como en los pertenecientes al grupo control y al grupo experimental.
2. la influencia que la variable tiempo de injerto pudiera tener en el hueso neoformado, en todos los animales del estudio, en el grupo control y en el grupo experimental
3. la existencia de diferencias en el hueso neoformado entre los grupos control y experimental en general, a las 12 semanas y a las 32 semanas del injerto.

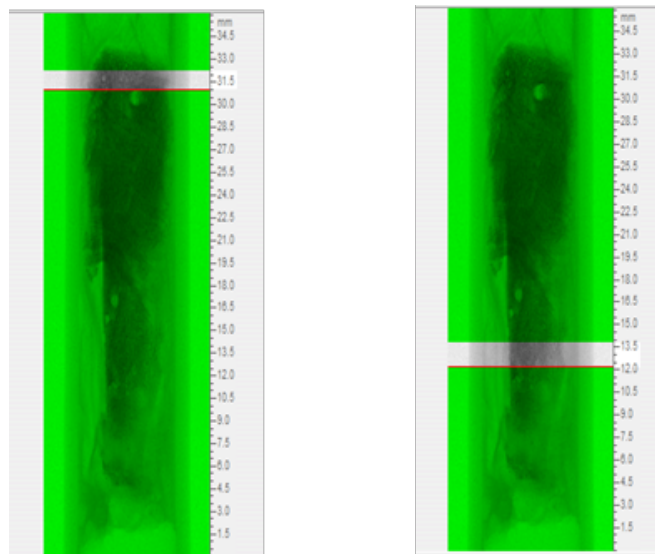


Fig. 47: Áreas de interés seleccionadas para el estudio con micro-CT en hueso nativo (residente) y hueso neoformado.

5.5.1. DIFERENCIAS ENTRE EL HUESO NATIVO Y EL NEOFORMADO EN CADA OVEJA

- **Grupo control**

Tras analizar el ajuste a la normalidad de los resultados obtenidos se evaluaron las diferencias mediante la t pareada, entre el hueso nativo y el neoformado en las cinco ovejas cuya reconstrucción no incorporaba células diferenciadas. Se revisaron las ocho variables detalladas en el apartado de material y método.

Aunque la densidad mineral ósea (BMD) fue mayor en el hueso nativo que en el neoformado, no se objetivó la significación de esta diferencia. Por el contrario tanto la ratio entre el volumen óseo y el volumen total de la región de interés, expresado en %, (BV/TV), y el número de trabéculas (expresado en 1/mm) fueron significativamente menores en el hueso neoformado. En cambio, la separación trabecular fue significativamente mayor en este último hueso. La interpretación de la variable SMI (Índice Estructural Medio) es muy debatida en la literatura. En nuestro estudio fue significativamente mayor en el hueso neoformado (Tabla. 2).

		Diferencias relacionadas				Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
				Superior	Inferior	
Par 1	BMD.R - BMD.N	,38606750	,50386870	-,41570004	1,18783504	,223
Par 2	BV.TV.R - BV.TV.N	51,7516300	15,2424262	27,4975285	76,0057315	,007
Par 3	Tb.Th.R - Tb.Th.N	,0715523	,0770412	-,0510375	,1941420	,160
Par 4	Tb.Sp.R - Tb.Sp.N	-,4068900	,2433508	-,7941154	-,0196646	,044
Par 5	Tb.N.R - Tb.N.N	2,2984458	,4322140	1,6106968	2,9861947	,002
Par 6	SMI.R - SMI.N	-5,4709625	1,9700192	-8,6057027	-2,3362223	,012
Par 7	DA.R - DA.N	-,5020250	,4211301	-1,1721369	,1680869	,097
Par 8	Conn.Dn.R - Conn.Dn.N	71,6965175	64,3882806	-30,7596054	174,1526404	,112

Tabla. 2: Prueba de muestras relacionadas, en las variables investigadas en el grupo control.

- **Grupo Experimental**

En los ocho animales injertados con la matriz y células el grado de mineralización del hueso neoformado fue significativamente menor que el del hueso residente. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en otras importantes variables (%BV/TV, número de trabéculas, separación trabecular, grosor trabecular), entre ambos (Tabla 3).

		Diferencias relacionadas			Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación tıp.	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
				Superior		Inferior
Par 1	BMD.R - BMD.N	,43978833	,40813264	,01147939	,86809727	,046
Par 2	BV.TV.R - BV.TV.N	21,3927500	24,1805412	-3,9831717	46,7686717	,082
Par 3	Tb.Th.R - Tb.Th.N	-,0160057	,1776284	-,2024152	,1704039	,834
Par 4	Tb.Sp.R - Tb.Sp.N	-,1032912	,1400717	-,2502874	,0437051	,131
Par 5	Tb.N.R - Tb.N.N	7,1646833	15,0522812	-8,6317170	22,9610837	,296
Par 6	SMI.R - SMI.N	-1,3280850	4,0816853	-5,6115510	2,9553810	,462
Par 7	DA.R - DA.N	3,0884333	7,9697012	-5,2752551	11,4521218	,386
Par 8	Conn.Dn.R - Conn.Dn.N	25,2759667	46,8796811	-23,9212414	74,4731748	,244

Tabla 3: Prueba de muestras relacionadas en grupo experimental.

- **Todos los animales del estudio**

Aunque la densidad mineral ósea (BMD) fue mayor en el hueso nativo (residente) que en el neoformado, no se objetivó la significación de esta diferencia. En el conjunto de los animales del presente estudio, la ratio entre el volumen óseo y el volumen total de la región de interés, expresado en %, (BV/TV) fue significativamente mayor en el hueso residente que en el neoformado. Por demás, este último tenía una mayor separación trabecular e índice estructural medio, con una menor conectividad (Tabla 4)

		Media	N	Desviación tıp.	Significación
Par 1	BMD.R	1,0383673	13	,30340497	0,060
	BMD.N	,5374182	13	,56436802	
Par 2	BV.TV.R	68,867273	13	19,1895580	0,010
	BV.TV.N	31,610523	13	37,6285765	
Par 3	Tb.Th.R	,213318	13	,1204431	0,551
	Tb.Th.N	,186990	13	,1377790	
Par 4	Tb.Sp.R	,170081	13	,0864968	0,009
	Tb.Sp.N	,450075	13	,3263281	
Par 5	Tb.N.R	6,426882	13	11,1858519	0,153
	Tb.N.N	1,341798	13	,9452046	
Par 6	SMI.R	-3,072855	13	3,6796223	0,017
	SMI.N	,243514	13	3,1726852	
Par 7	DA.R	3,604745	13	5,9238028	0,458
	DA.N	10,402518	13	28,0106228	
Par 8	Conn.Dn.R	85,124436	13	55,3168898	0,017
	Conn.Dn.N	38,375575	13	49,9856824	

Tabla 4: Prueba de muestras relacionadas en grupo todos los animales.

5.5.2. DIFERENCIAS ENTRE EL HUESO NATIVO Y EL NEOFORMADO EN CADA OVEJA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE INJERTO

Se compararon los resultados obtenidos a las 32 semanas con los obtenidos a las 12 semanas. Para ello se creó una variable relativa en cada individuo tomando como referencia el hueso nativo o residente. Se utilizó la prueba t de Student, y se analizaron los resultados en el grupo control, el grupo experimental y el total de las ovejas de la muestra.

• Grupo Control

Como se detalla en la tabla 5, la BMD, y el cociente BV/TV mostraron valores significativamente mayores en el hueso neoformado a las 32 semanas, con relación al presente a las 12 semanas del injerto.

	Semanas	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	Sig. (bilateral)
BMD.N	12	2	-,1429400	.	.	.
	32	3	,7036333	,14135816	,08161317	,035
BV.TV.N	12	2	,361480	.	.	.
	32	3	11,348667	1,8540702	1,0704479	,036
Tb.Th.N	12	2	,085321	.	.	.
	32	3	,154453	,0351598	,0202995	,231
Tb.Sp.N	12	2	,503860	.	.	.
	32	3	,697550	,3512394	,2027881	,680
Tb.N.N	12	2	,042367	.	.	.
	32	3	,766050	,2379982	,1374083	,119
SMI.N	12	2	3,331900	.	.	.
	32	3	1,492683	1,0999466	,6350544	,285
DA.N	12	2	2,478800	.	.	.
	32	3	2,175600	,7178877	,4144726	,750
Conn.Dn.N	12	2	,625430	.	.	.
	32	3	14,113167	9,8730180	5,7001896	,358

Tabla 5: Prueba de muestras independientes en el grupo control.

• Grupo Experimental

Las ovejas injertadas con la matriz celular durante 32 semanas mostraron en el hueso neoformado un mayor grado de mineralización, mayor porcentaje de hueso, mayor grosor trabecular con una menor separación entre las trabéculas. Sin embargo, no observamos diferencias en el número de trabéculas entre ambos tiempo de injerto. También se observaron diferencias en las variables SMI y Conectividad (Tabla 6).

	Semanas	N	Media	Desviación típ.	Significación
BMD.N	12	4	,1175933	,14330225	0,02
	32	4	1,2418667	,21096119	
BV.TV.N	12	4	14,814833	8,0222307	0,001
	32	4	89,356333	2,8059723	
Tb.Th.N	12	4	,077201	,0239440	0,001
	32	4	,393290	,0188883	
Tb.Sp.N	12	4	,330627	,1392656	0,073
	32	4	,136127	,0112358	
Tb.N.N	12	4	1,834933	,7537129	0,378
	32	4	2,277433	,1720578	
SMI.N	12	4	1,806233	,3969744	0,001
	32	4	-4,527167	,4047505	
DA.N	12	4	1,907133	,2001586	0,357
	32	4	2,071433	,1867861	
Conn.Dn.N	12	4	111,64133	34,6187109	0,008
	32	4	13,885333	3,0789154	

Tabla 6: Prueba de muestras independientes en el grupo experimental

- **Todos los animales de la muestra**

En los 13 animales del estudio el hueso neoformado a las 32 semanas del injerto mostró un mayor grado de mineralización, con más cantidad de nuevo hueso y un mayor grosor trabecular (Tabla 7).

	Semanas	N	Media	Desviación típ.	Significación
BMD.N	12	6	,0524600	,17509929	0,010
	32	7	,9727500	,33571303	
BV.TV.N	12	6	11,201495	9,7534086	0,046
	32	7	50,352500	42,7794722	
Tb.Th.N	12	6	,079231	,0199673	0,015
	32	7	,273872	,1332294	
Tb.Sp.N	12	6	,373935	,1429419	0,837
	32	7	,416838	,3794166	
Tb.N.N	12	6	1,386792	1,0872192	0,830
	32	7	1,521742	,8484001	
SMI.N	12	6	2,187650	,8288388	0,043
	32	7	-1,517242	3,3795059	
DA.N	12	6	2,050050	,3292562	0,449
	32	7	17,456850	37,9169910	
Conn.Dn.N	12	6	83,887358	62,2904711	0,110
	32	7	13,999250	6,5420222	

Tabla 7: Prueba de muestras independientes en todos los animales del estudio.

5.5.3. DIFERENCIAS EN EL HUESO NEOFORMADO ENTRE EL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO EXPERIMENTAL

- **A las 12 semanas del injerto**

Entre las dos ovejas del grupo control y las cuatro del grupo experimental no observamos diferencias significativas del hueso neoformado en ninguna de las ocho variables investigadas (Tabla 8).

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias			
		F	Sig.	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
						Superior	Inferior
BMD.N	Se han asumido varianzas iguales	.	.	,256	-,26053333	-,97249837	,45143170
	No se han asumido varianzas iguales	.	.	.	-,26053333	.	.
BV.TV.N	Se han asumido varianzas iguales	.	.	,259	-14,4533533	-54,3100050	25,4032984
	No se han asumido varianzas iguales	.	.	.	-14,4533533	.	.
Tb.Th.N	Se han asumido varianzas iguales	.	.	,797	,0081197	-,1108409	,1270802
	No se han asumido varianzas iguales	.	.	.	,0081197	.	.
Tb.Sp.N	Se han asumido varianzas iguales	.	.	,394	,1732333	-,5186764	,8651431
	No se han asumido varianzas iguales	.	.	.	,1732333	.	.
Tb.N.N	Se han asumido varianzas iguales	.	.	,176	-1,7925663	-5,5372194	1,9520867
	No se han asumido varianzas iguales	.	.	.	-1,7925663	.	.
SML.N	Se han asumido varianzas iguales	.	.	,080	1,5256667	-,4466114	3,4979447
	No se han asumido varianzas iguales	.	.	.	1,5256667	.	.
DA.N	Se han asumido varianzas iguales	.	.	,132	,5716667	-,4227762	1,5661096
	No se han asumido varianzas iguales	.	.	.	,5716667	.	.
Conn.Dn.N	Se han asumido varianzas iguales	.	.	,109	-111,0159033	-283,0111940	60,9793873
	No se han asumido varianzas iguales	.	.	.	-111,0159033	.	.

Tabla 8: Prueba de muestras independientes a las 12 semanas entre las ovejas del grupo control y las del grupo experimental.

• **A las 32 semanas del injerto**

Con mayor tiempo de injerto el hueso neoformado en las ovejas del grupo experimental tenía un mayor grado de mineralización, mayor volumen relativo de hueso nuevo, un mayor número de trabéculas, con menor separación y mayor grosor (Tabla 9).

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias			
		F	Sig.	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
						Superior	Inferior
BMD.N	Se han asumido varianzas iguales	1,063	,361	,021	-,53823333	-,94529829	-,13116837
	No se han asumido varianzas iguales			,027	-,53823333	-,96959804	-,10686862
BV.TV.N	Se han asumido varianzas iguales	1,226	,330	,000	-78,0076667	-83,3987998	-72,6165336
	No se han asumido varianzas iguales			,000	-78,0076667	-83,7420894	-72,2732439
Tb.Th.N	Se han asumido varianzas iguales	2,101	,221	,000	-,2388367	-,3028152	-,1748582
	No se han asumido varianzas iguales			,002	-,2388367	-,3112905	-,1663829
Tb.Sp.N	Se han asumido varianzas iguales	12,736	,023	,050	,5614233	-,0018948	1,1247415
	No se han asumido varianzas iguales			,109	,5614233	-,3098435	1,4326902
Tb.N.N	Se han asumido varianzas iguales	,336	,593	,001	-1,5113833	-1,9821444	-1,0406222
	No se han asumido varianzas iguales			,001	-1,5113833	-2,0009662	-1,0218005
SML.N	Se han asumido varianzas iguales	3,009	,158	,001	6,0198500	4,1410729	7,8986271
	No se han asumido varianzas iguales			,006	6,0198500	3,6225793	8,4171207
DA.N	Se han asumido varianzas iguales	2,790	,170	,820	,1041667	-1,0849082	1,2932415
	No se han asumido varianzas iguales			,828	,1041667	-1,5439111	1,7522444
Conn.Dn.N	Se han asumido varianzas iguales	5,627	,077	,971	,2278333	-16,3501407	16,8058074
	No se han asumido varianzas iguales			,973	,2278333	-21,8683062	22,3239729

Tabla 9: Diferencias del hueso nuevo entre el grupo control y el experimental a las 32 semanas del injerto (t-test).

- **En todos los animales de la muestra**

Con independencia del tiempo de injerto, el nuevo hueso obtenido con los dos tipos de injerto aplicados, pone de relieve que el empleo de células diferenciadas se acompaña de un mayor porcentaje relativo de hueso neoformado y de un mayor número de trabéculas (Tabla 10) y Figs. 48 y 49)

	Grupo	N	Media	Desviación típ.	Significación
BMD.N	Caso	8	,5633771	,65760444	0,852
	Control	5	,4919900	,43874027	
BV.TV.N	Caso	8	44,758324	42,2966481	0,045
	Control	5	8,601870	5,6983581	
Tb.Th.N	Caso	8	,215459	,1674179	0,280
	Control	5	,137170	,0449329	
Tb.Sp.N	Caso	8	,336331	,3002705	0,132
	Control	5	,649128	,3026962	
Tb.N.N	Caso	8	1,774180	,8971412	0,036
	Control	5	,585129	,4107205	
SMI.N	Caso	8	-,733043	3,5903691	0,111
	Control	5	1,952488	1,2854057	
DA.N	Caso	8	1,917443	,2604998	0,389
	Control	5	25,251400	46,4026223	
Conn.Dn.N	Caso	8	54,166629	57,5241442	0,095
	Control	5	10,741233	10,5101895	

Tabla 10: Diferencias del hueso nuevo entre el grupo control y el experimental en todos los animales del estudio. (t-test).

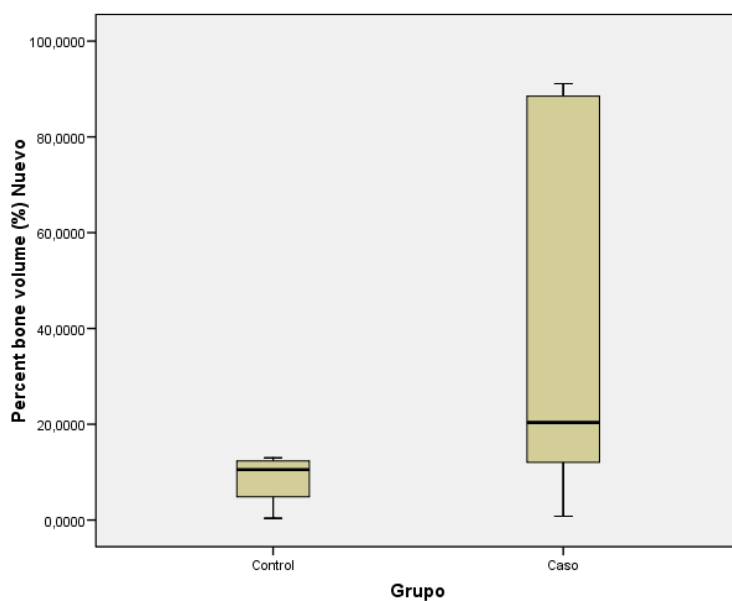


Fig. 48: Volumen relativo de hueso neoformado entre ambos grupos.

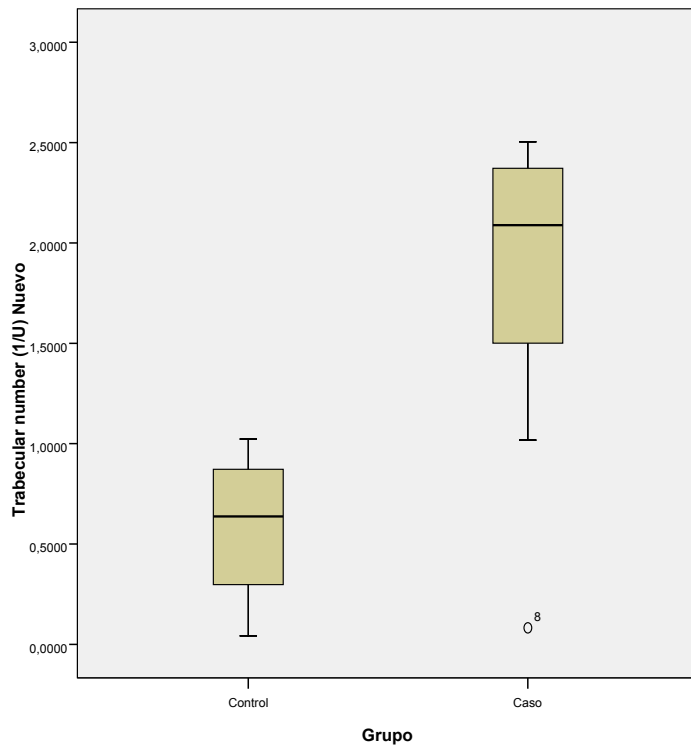


Fig 49: Diagrama de barras. Número de trabéculas entre ambos grupos.

5.6 RESULTADOS DEL ANÁLISIS CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Tal como se describió en el material y método, la figura 26 describe la zona de la mandíbula de la oveja de la que se obtuvieron las muestras para ser analizadas con el MEB. Dichas muestras correspondían a una zona de hueso neoforado y otra a hueso residente, situándose éste último por encima de un agujero que se generó como referencia para el estudio (Fig. 50).

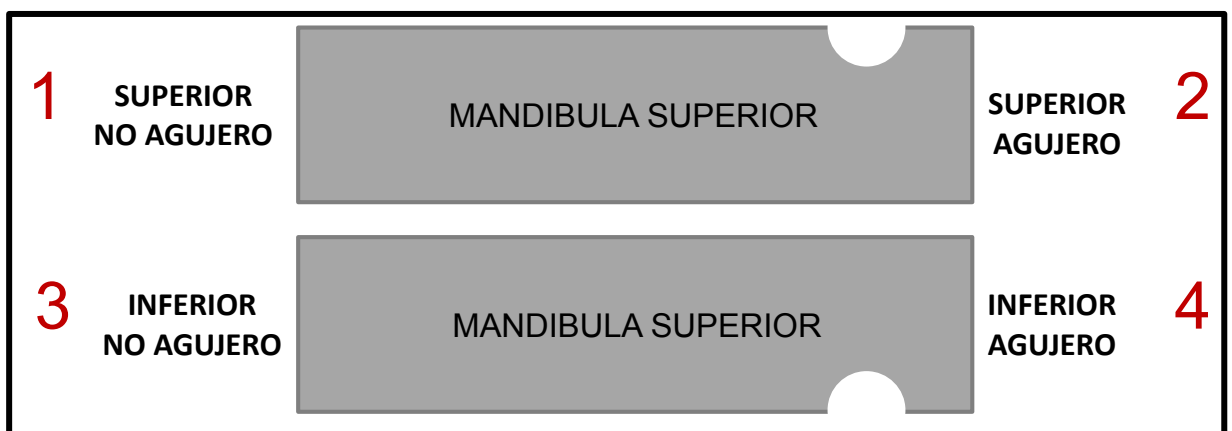


Fig. 50: Esquema representando las dos vertientes analizados con el MEB de la muestra de hueso.

En la única muestra ósea investigada procedente de una oveja sacrificada a las 32 semanas del injerto, la topografía del hueso se observó mejor en alto vacío con electrones retrodispersados que en bajo vacío. En todo caso, las características del hueso nativo (residente) (Fig. 51) eran claramente diferentes a las del hueso neoformado, en el cual aún había zonas sin osificar (áreas más oscuras) (Fig. 51).

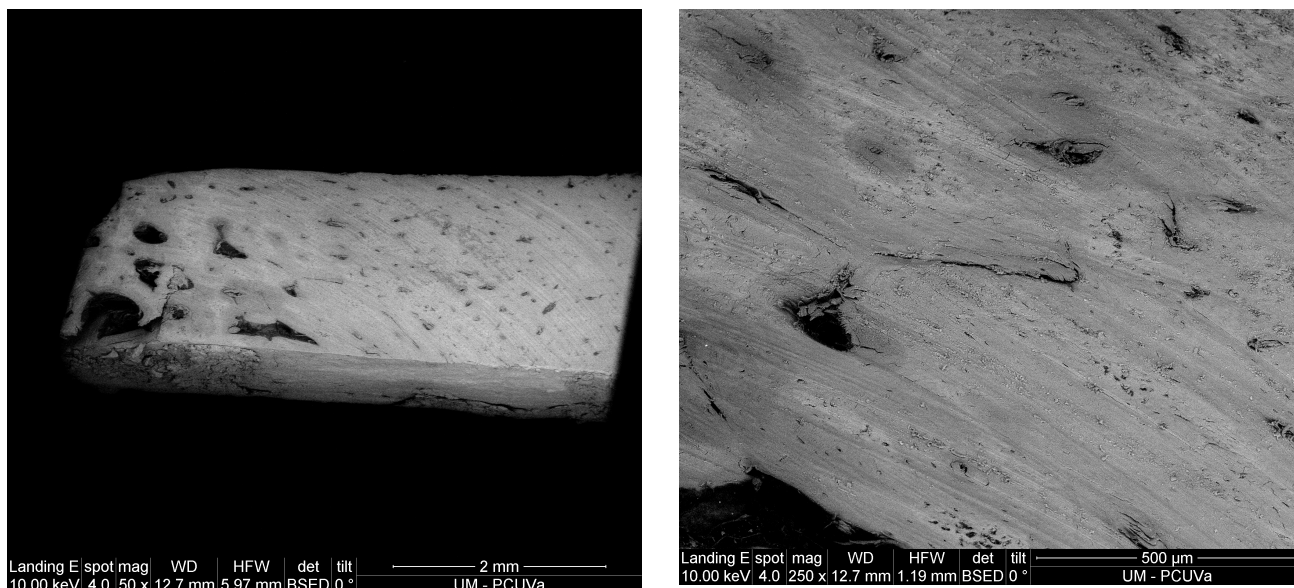


Fig. 51: Microscopia electrónica de barrido (12 µm x 18 µm) correspondiente al área de hueso nativo en el que se objetiva un importante grado de madurez

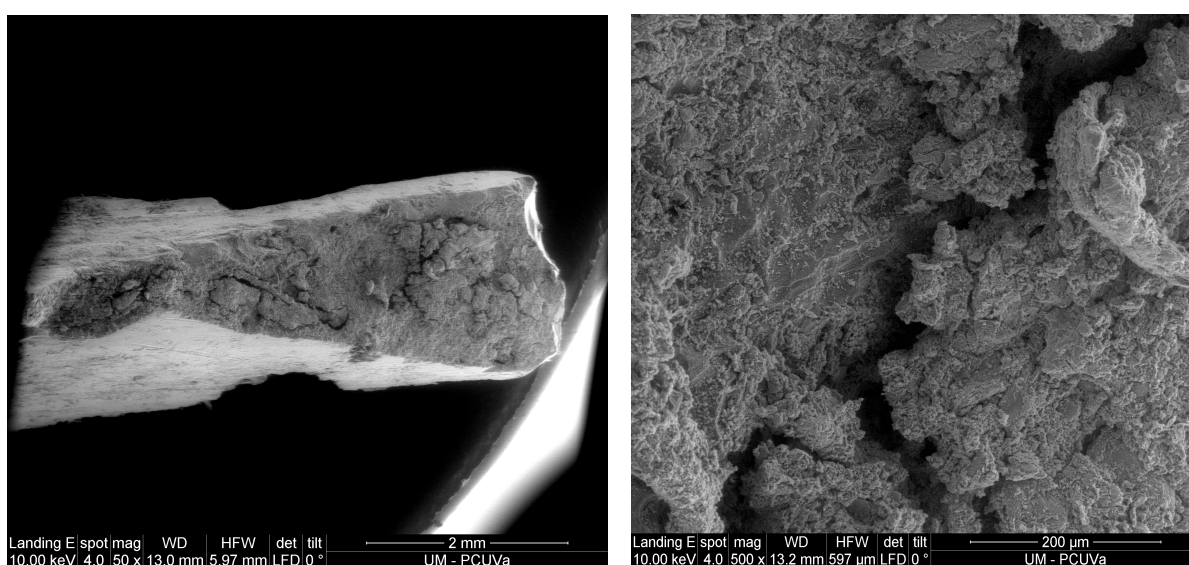


Fig. 52: Microscopia electrónica de barrido (12 µm x 18 µm) correspondiente al área de hueso neoformado, en el que se objetiva una porosidad de 301 nm

5.7 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

La histología de la reparación ósea observada en los grupos T12 y T32 fue examinada en secciones de tejido decalcificado y teñidas mediante hematoxilina-eosina (H&E) y Tricrómico de Masson.

El estudio de las áreas anterior, central y posterior de los especímenes mostró que la zona central neoformada parecía ser más inmadura. Por eso, se tomó esta región como zona de comparación entre grupos. Imágenes representativas de cada grupo se presentan en la figura 53.

El estudio histológico llevado a cabo en los injertos mostró que la matriz sérica se había reabsorbido casi por completo en todos los animales, siendo sustituida por tejido neoformado con grados variables de osificación.

En el grupo T12, la oveja del grupo Control en la que se había observado inicio de osificación en las imágenes de TC convencional, mostraba algunas áreas de tejido osteoide inmaduro en la zona del injerto, rodeado por tejido fibroso (Fig. 54), mientras que en la otra oveja en la que no se había observado osificación en el TC sólo se encontró tejido fibroso. Además, se pudieron observar algunos restos degradados de scaffold en ambas ovejas.

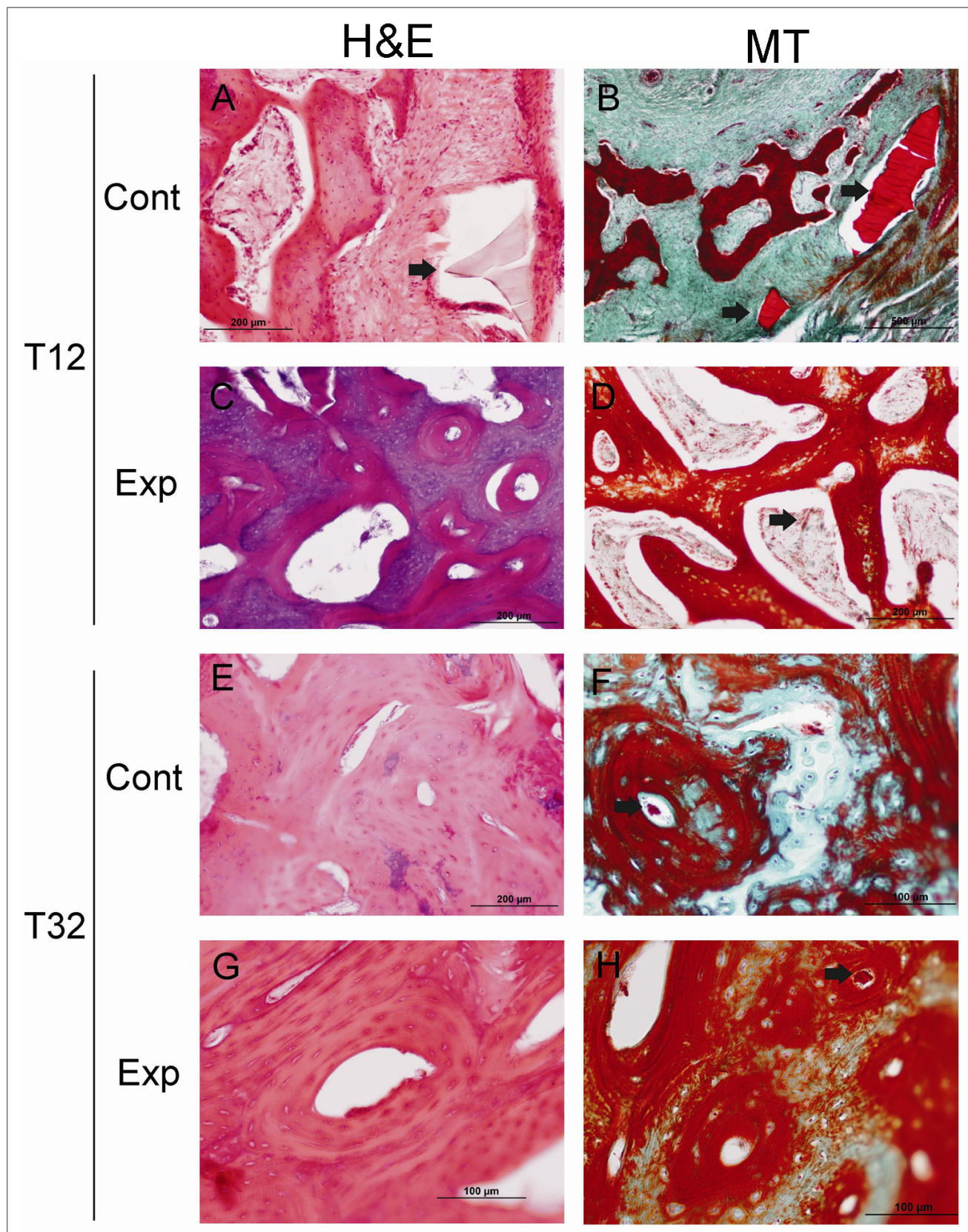


Fig. 53: Características histológicas de cada grupo de estudio. Tinciones de hematoxilina-eosina y Tricrómico de Masson.

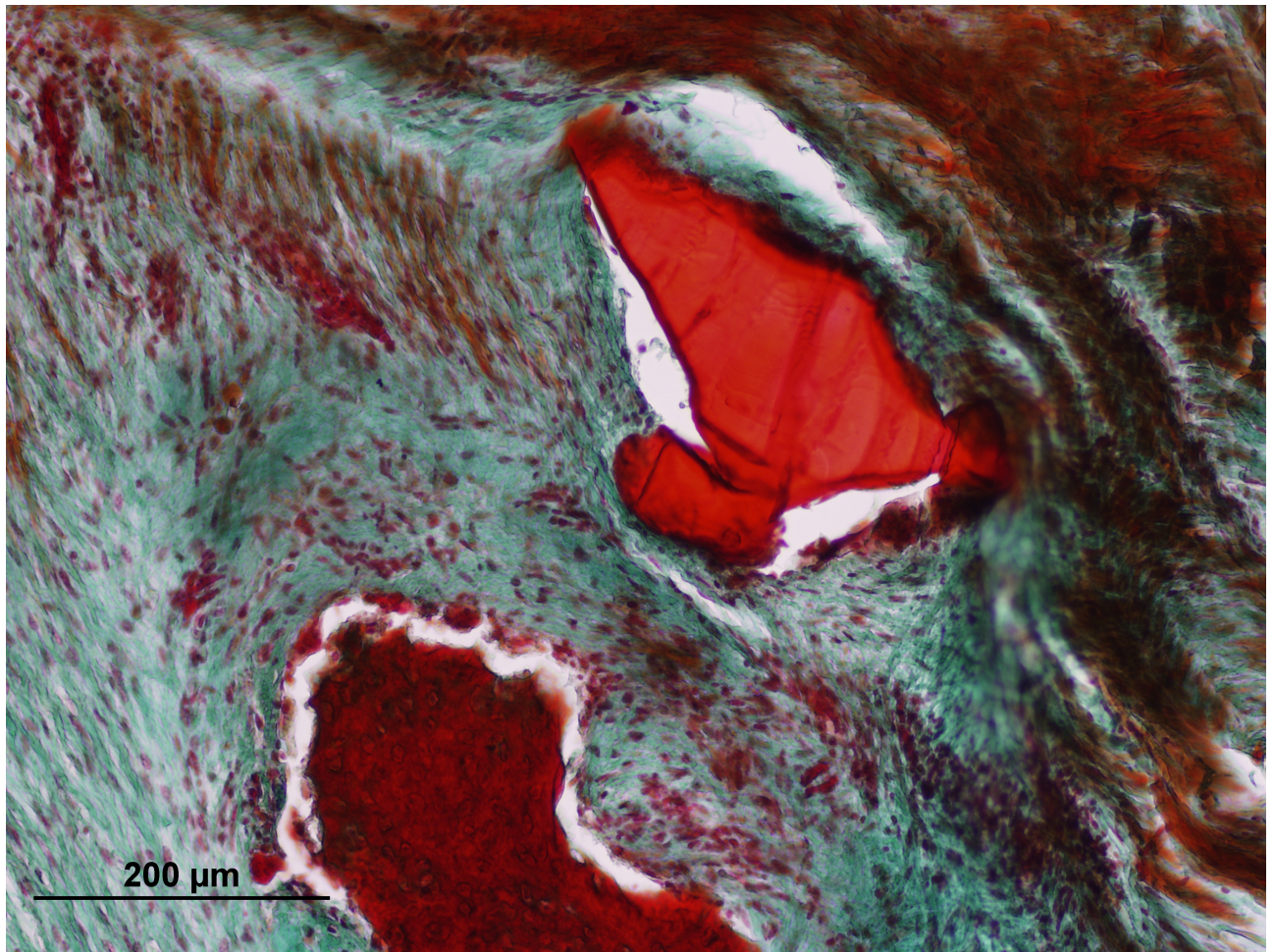


Fig. 54: Imagen de microscopía óptica (tinción Tricrómico de Masson) donde se aprecia tejido osteoide inmaduro y restos de scaffold degradado.

En cuanto a los animales del grupo Experimental, la mayoría mostraron un alto nivel de osificación del injerto, lo cual se correlaciona con los resultados del TC convencional. En este grupo, se puede observar el inicio de la formación de osteonas, rodeadas por tejido inmaduro. También se observaron, aunque en menor cuantía, restos de scaffold degradado. (Fig. 55)

En el T32 los animales de ambos grupos, Control y Experimental, mostraron un alto nivel de osificación del injerto comparado con el T12. El tejido neoformado del grupo Control mostró algunas osteonas rodeadas por un áreas de tejido inmaduro irregular (Fig 56).

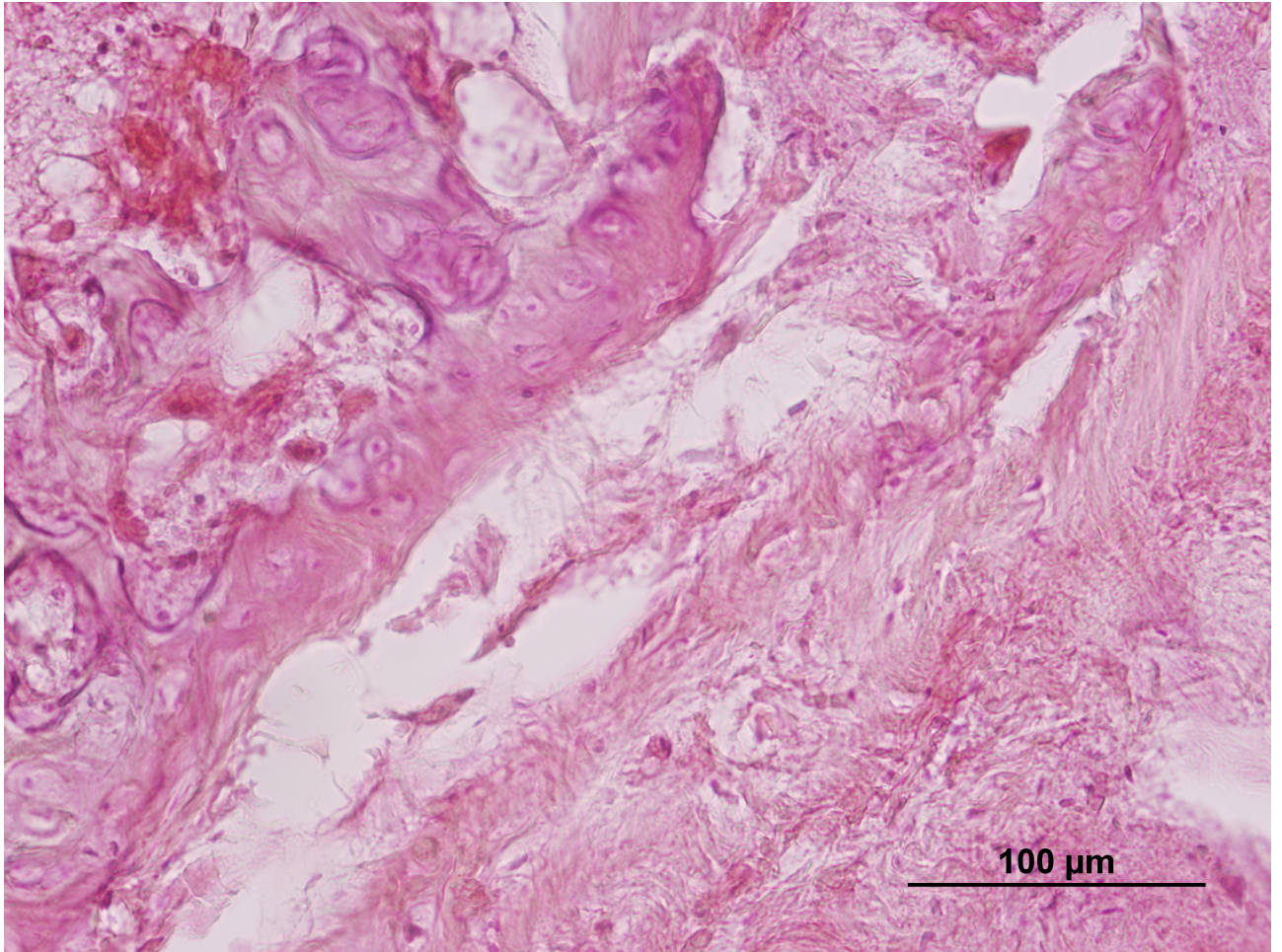


Fig. 55: Imagen de microscopía óptica (hematoxilina-eosina) donde se aprecia el inicio de formación de osteonas.

En el grupo Experimental, el tejido neoforado mostró mayor madurez y osificación que el grupo Control, con un alto número de osteonas rodeadas por una matriz de carácter más regular. La tinción de Masson mostró un alto grado de mineralización del injerto en el grupo Experimental. (Fig. 57) Asimismo se pudieron observar pequeñas trazas de scaffold degradado en ambos grupos.

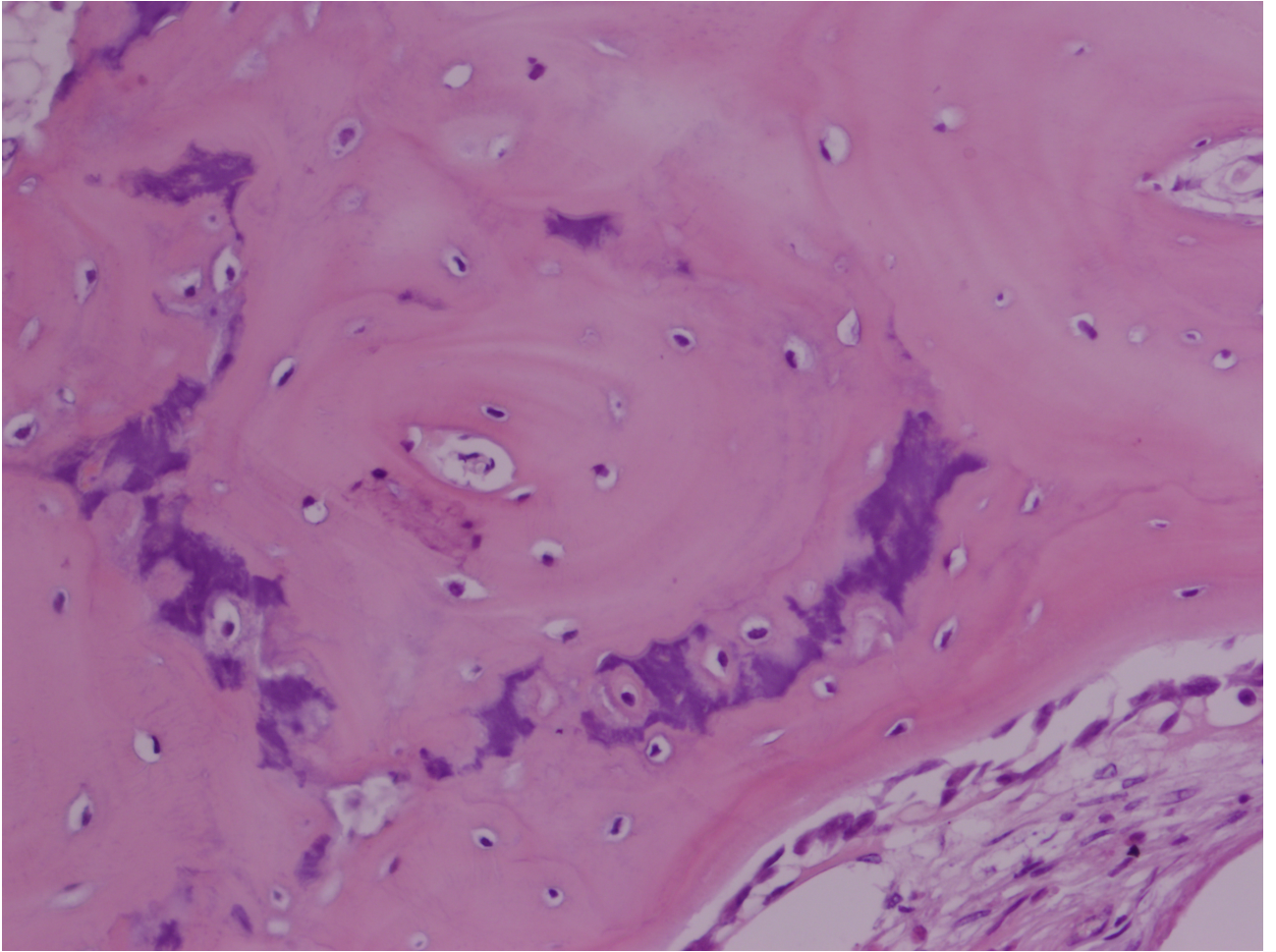


Fig. 56: Imagen de microscopía óptica (hematoxilina – eosina) mostrando osteonas rodeadas de tejido inmaduro.

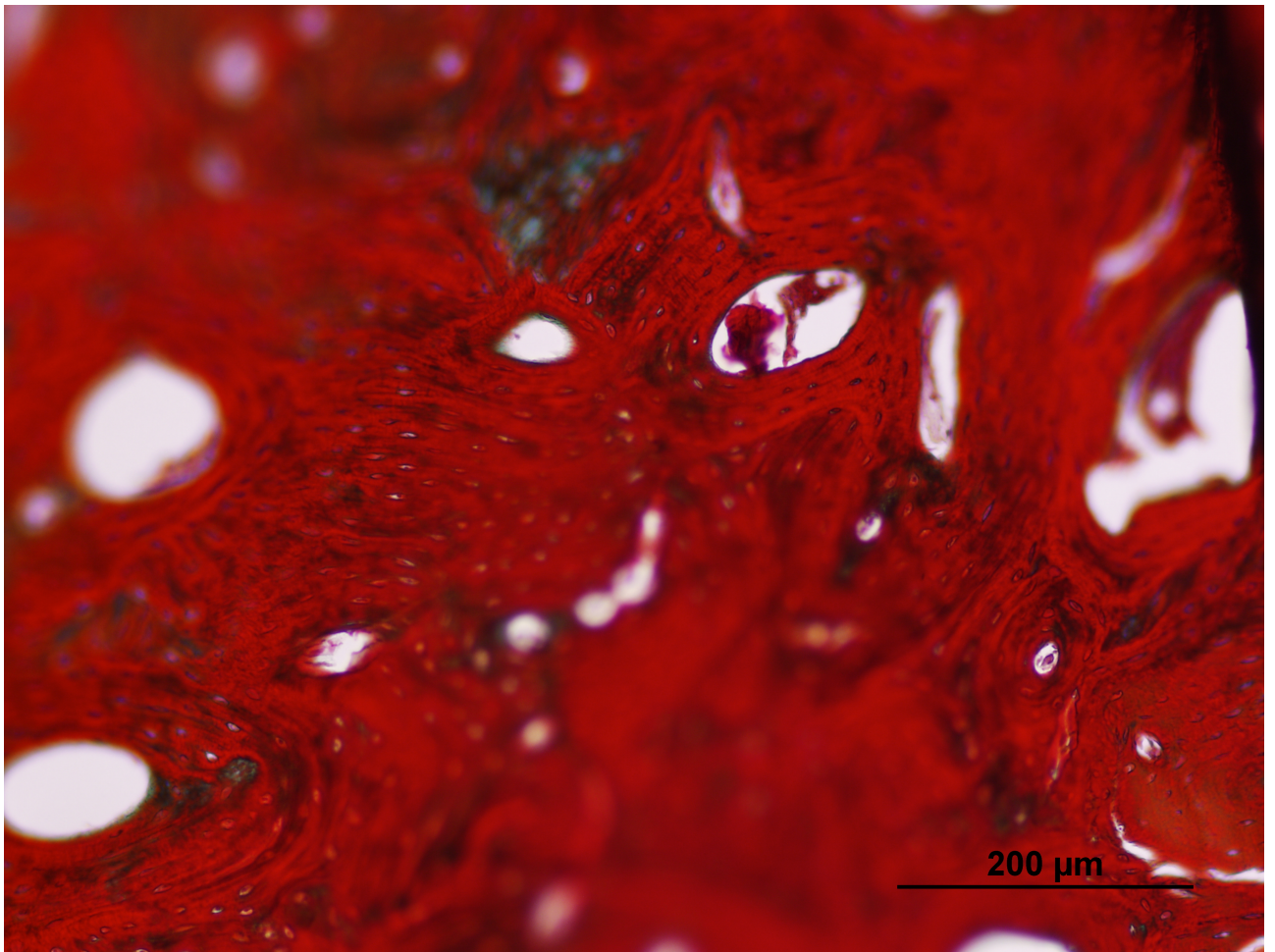


Fig. 57: Imagen de microscopía óptica (tricromico de Masson) donde se aprecia el alto grado de mineralización, puesto de manifiesto por la coloración roja.

La reconstrucción de los defectos mandibulares continúa siendo un importante reto, para los cirujanos maxilofaciales de todo el mundo. El hueso es, después de la sangre el segundo tejido más frecuentemente trasplantado⁷⁵. En el 2010, las ventas de sustitutos de injertos óseos fueron valoradas en 1.3 billones de dólares en Estados Unidos con una previsión de ascender a 2.3 billones para el 2017.⁷⁶

Los injertos de hueso autólogo junto con los colgajos microvascularizados representan en la actualidad el “*gold standard*”, para la rehabilitación de los defectos óseos de los maxilares.⁷⁷ No obstante, son técnicas que requieren de prolongados tiempos quirúrgicos, cirujanos con experiencia y conllevan un mayor o menor grado de morbilidad para el paciente que las sufre.

Tal vez por ello, desde el año 1930 cuando el cirujano francés Alexis Carrel se obsesionó con la criopreservación de arterias y la anastomosis de pequeños vasos sanguíneos se han venido sucediendo una serie de aportaciones trascendentes para la ciencia y para la vida de los seres humanos como han sido los trasplantes celulares, los trasplantes de órganos, la Ingeniería Tisular y la Medicina Regenerativa.⁷⁸

Los tres elementos básicos de la Ingeniería Tisular Ósea son matriz, células y factores de crecimiento. Cada uno de estos tres elementos se han ido investigando por separado y la información científica de la que disponemos es en el momento actual muy esperanzadora.

6.1 NUESTRO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN: LA OVEJA Y SUS DEFECTOS CRÍTICOS

La utilización de animales vivos en la formación médica está decayendo en las escuelas y facultades americanas, pasando de su empleo en el 90% de los centros en el año 1987 al 32% en el año 2001 (fig. 58).⁷⁹

Este descenso no es tan notorio en la investigación sobre ingeniería tisular, puesto que a pesar de que el desarrollo de modelos 3D y de biorreactores ha permitido un mejor estudio del comportamiento celular *in vitro*, los estudios *in vivo* continúan siendo

fundamentales para evaluar la eficacia y la seguridad preclínica de los productos investigadores.⁸⁰⁸¹

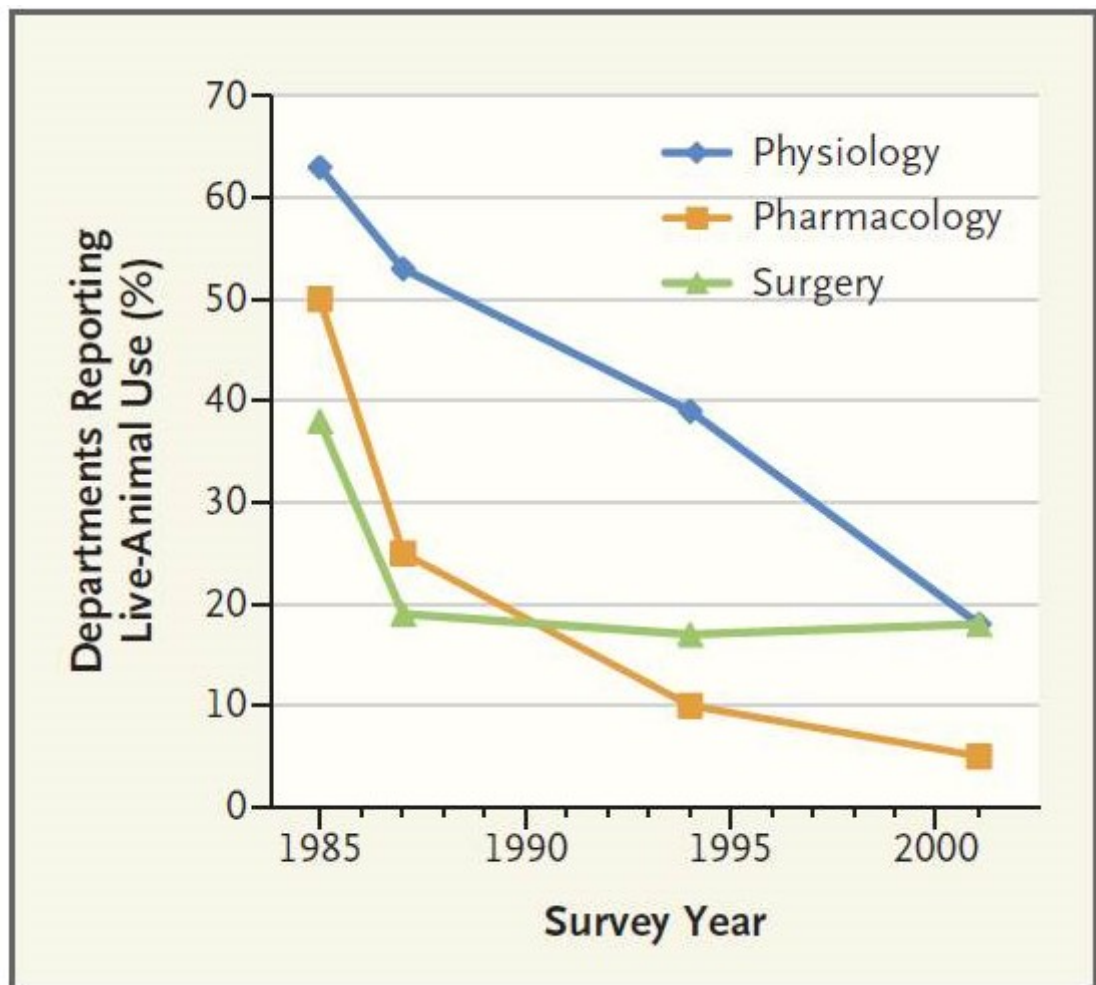


Fig. 58. Representación gráfica del descenso en la utilización de animales en la formación médica de EEUU.

Los trabajos previo de nuestro grupo investigador utilizaban animales de pequeño tamaño (ratones/ratas) y evaluaban la reparación mandibular de defectos críticos realizados en los ángulos mandibulares de estos animales.⁸²⁸³⁸⁴

Con el presente estudio se da el salto hacia el empleo de animales de gran tamaño.

A este respecto, los cerdos continúan siendo uno de los animales de mayor uso experimental por su similitud fisiológica con el ser humano, tamaño y relativo bajo coste.⁸⁵

Sin embargo para el presente estudio optamos por la selección de la oveja como animal de estudio, al disponer de experiencia previa en su manejo por otros trabajos previos no publicados.

En el año 2012, Lammens et al⁸⁶ desarrollaron el denominado Pentaconcepto de la ingeniería tisular ósea.

El principal desafío en la evaluación de los nuevos productos de ingeniería tisular ósea, como el descrito en la presente tesis doctoral, es la generación de un modelo que refleje la verdadera situación clínica que suele acompañar al lecho quirúrgico de los pacientes a los que se quiere aplicar el nuevo producto.

En este sentido nuestro modelo incluía cuatro elementos: células, matriz, estabilidad mecánica y alteración del lecho por la cirugía y por la colocación de un nuevo material (FullCure 720®). Adolecía, sin embargo, de la incorporación de factores de crecimiento exógenos.

La naturaleza segmentaria del defecto creado en la mandíbula de nuestras ovejas (3 cm, más del doble del tamaño del cuerpo mandibular del animal), la eliminación del periostio (por vestibular) y la edad de las ovejas del experimento (todas adultas) no nos hizo pensar en la posibilidad de que nuestro modelo experimental no fuera un defecto verdaderamente crítico.

Sin embargo, algunos trabajos recientes sobre el tamaño crítico de los defectos segmentarios en tibia de ovejas, en los que se pone en evidencia una regeneración espontánea de defectos de 3 cm a las 6 semanas de la cirugía, nos deben hacer extremar las condiciones experimentales.⁸⁷

En nuestro caso tal vez hubiera sido recomendable la realización de una mayor desperiostización del segmento lingual del área ostectomizada.

Otra limitación de nuestro modelo animal fue la falta de evaluación de la actividad masticatoria (*in vivo*) de las ovejas intervenidas⁸⁸ y, finalmente, la no realización de estudios (necropsia, radiología) de los dos animales muertos pertenecientes al grupo experimental.

Con todo, consideramos que las condiciones de fiabilidad del defecto experimental investigado eran lo suficientemente consistentes para avalar nuestros resultados.

6.2 NUESTRA MATRIZ (ALBÚMINA PLASMÁTICA DE OVEJA) Y SU CAMISA DE SOPORTE (FULLCURE®)

Kon et al⁸⁹ crearon segmentos críticos en la tibia de ovejas que sacrificaron a los dos meses de aplicarles un injerto de hidroxiapatita (100%). Observaron que la formación

ósea alcanzada con la utilización de esta matriz se limitaba de manera exclusiva a la superficie periférica de la hidroxiapatita (nunca en el interior de los poros).

Otros autores⁹⁰ repitieron el experimento previo utilizando una matriz de coral de rápida reabsorción, observando que no era posible alcanzar una regeneración ósea. Modificando la matriz con la combinación de hidroxiapatita los resultados en la neoformación ósea mejoraron (reparación del defecto en cinco de siete ovejas) pero siempre que el constructo incluyera células madre osteoformadoras.

Skelite™ es una cerámica reabsorbible compuesta por estabilizada con fosfato tricálcico alfa (Si-TCP) utilizada para la reparación de defectos críticos en la tibia de ovejas. Algunos autores⁹¹ observaron reparación completa del defecto a los dos años de la cirugía con reabsorción completa del scaffold, pero siempre que se mantenga intacto un 10-20% del periostio del área receptora. Sin embargo esta matriz no parece tener el mismo comportamiento cuando se combina con células osteoformadoras. Sus resultados empeoran.

Yuan y cols.⁹² realizaron un estudio muy similar al presente trabajo. Son dos las principales diferencias:

- 1) Utilización de un animal experimental diferente: perros
- 2) Empleo de una de las matrices de mayor aceptación en la ingeniería tisular ósea: fosfato tricálcico (β) en bloques

En los defectos segmentarios mandibulares de sus animales observaron que la combinación de esta matriz junto a células diferenciadas *in vitro* de médula ósea (similares a las del presente estudio) posibilitaba una reparación del defecto a las 26 semanas del injerto. Por el contrario, cuando la reparación se evaluó con el exclusivo empleo de la matriz, no se constató neoformación ósea (fig. 59)

Frente a estos resultados, el scaffold sérico utilizado en nuestro trabajo es sólido tal y como se refleja en los estudios previamente realizados utilizando un reómetro extensional. Los mayores valores de stress que puede soportar antes de su deformación crítica sigma es de 39 pascales.^{82 83 84} (Fig. 60)

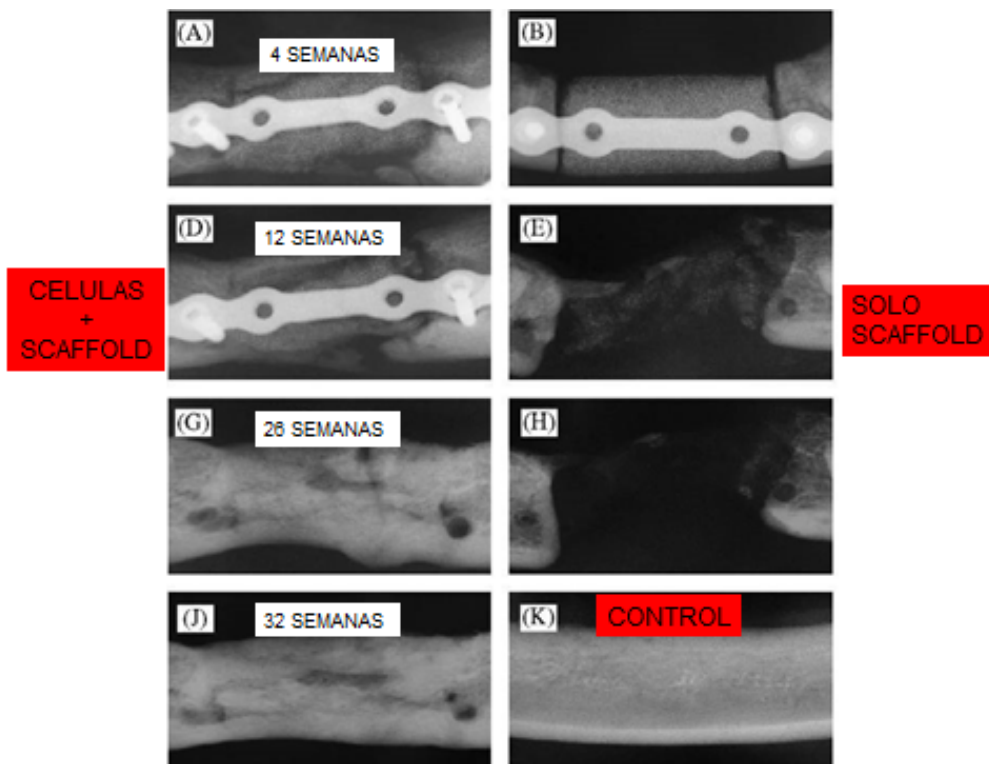


Fig. 59: Ineficacia del scaffold en la reparación del defecto segmentario (Tomado de Yuan et al.⁹⁴)

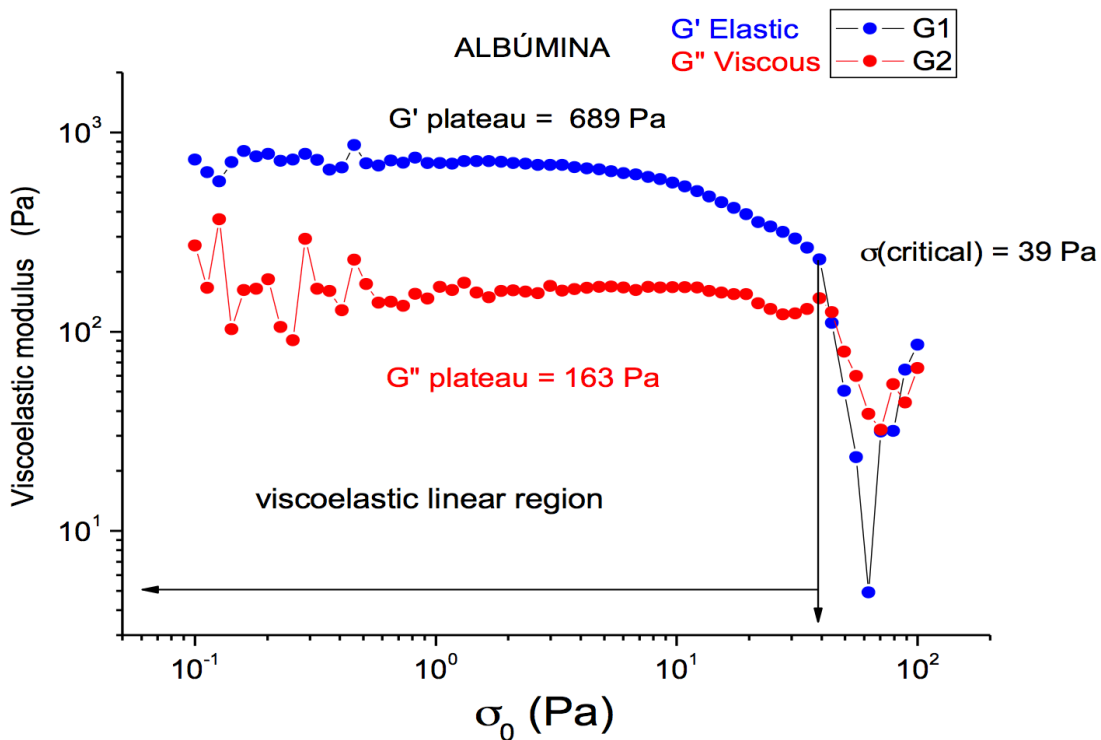


Fig. 60: En el análisis reométrico del scaffold de albumina plasmática se apreció como valor de deformación crítica los 39 Pa.

Pese a ello, nuestro equipo investigador no tenía plena confianza en que pudiera soportar la carga mecánica esperada durante la masticación de una oveja, ni que su fijación con tornillos de titanio resultara lo suficientemente consistente como para garantizar su inmovilidad. Para hacer frente a esta inseguridad, se optó por dos diferentes vías. Una de ellas, desarrollada por los biólogos del equipo, pretendía mejorar la resistencia mecánica de la matriz, promoviendo una combinación de la misma con *fibroína*, uno de los dos componentes de la seda, obtenido principalmente del gusano *Bombyx Mori*. Que nosotros sepamos, se han utilizado soportes de *fibroína* sola o combinada con otros compuestos como hidroxapatita, incorporando en algunos casos factores osteoinductores con resultados prometedores para la formación ósea.⁹³⁹⁴

De otra parte, los cirujanos del grupo investigador, preferimos elaborar una camisa de soporte para la matriz, a semejanza de una malla de titanio. Para evitar el incremento de coste inherente a esta última, se investigó el comportamiento biológico del fotopolímero seleccionado (Fullcure 720®) en ratas Wistar, comparándolo con un material de empleo habitual en cirugía maxilofacial como es el polietileno. La gran ventaja que ofrece el Fullcure® no solo se cimienta en su bajo precio (80 euros) sino que deriva de su posible prototipado rápido en impresoras tridimensionales con el sistema CAD/CAM.⁸³

Los resultados de la aplicación de este soporte de Fullcure^R para la matriz no podemos considerarlos satisfactorios.

Por un lado, si bien pudimos constatar su parcial osificación en alguna de las ovejas, también observamos su tendencia a desplazamientos indeseados (Fig. 61).

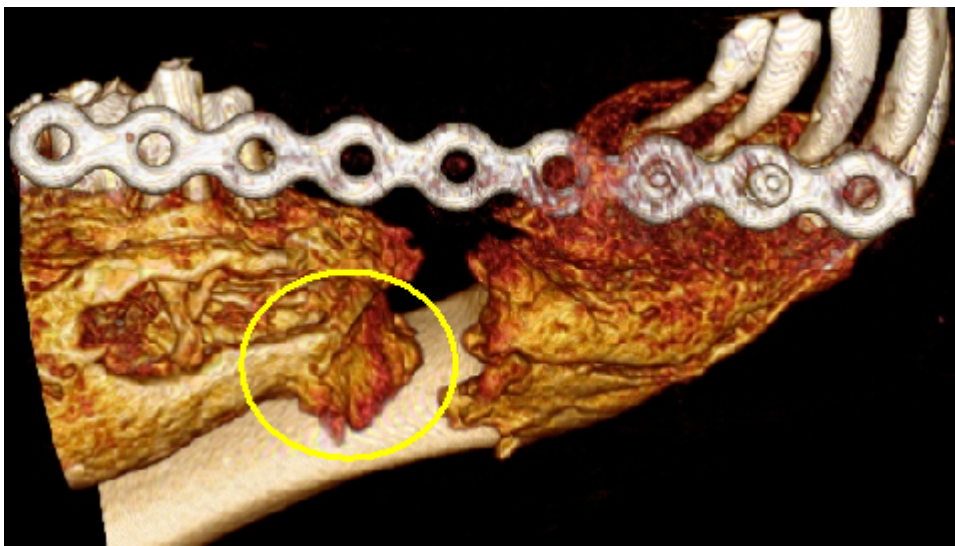


Fig. 61: Oveja control (T32) en las que se observa calcificación parcial y desplazamiento caudal del soporte de la matriz.

De otra parte, algunos de los animales injertados presentaron una excesiva formación ósea, por lo cual la restauración del contorno mandibular no fue óptima, pese haberse alcanzado una unión satisfactoria de los fragmentos. Es posible que el diseño de ingeniería que se realizó para nuestro experimento tuviera sus limitaciones. Por un lado, la migración del scaffold fuera del container de Fullcure nos hizo plantear si una mayor dimensión vertical hubiese evitado el desplazamiento de la matriz y quizá también contener o dirigir mejor la neoformación ósea. No obstante, la realización de una osteotomía ligeramente biselada en vez de completamente recta podría haber influido en la migración del scaffold debido a una peor adaptación del mismo en el defecto segmentario, disminuyendo el área de contacto entre él y el hueso mandibular y por tanto acarreado una peor estabilidad del constructo.

Por otro lado, a pesar de que una mayor altura del soporte de FullCure® hubiese contribuido a una mayor estabilidad de la matriz a la vez que a la contención y guía de la neoformación ósea, no debemos obviar que una estimulación mecánica subóptima en el hueso neoformado probablemente conlleve un remodelado insatisfactorio debido a un defecto en la transferencia de cargas (*stress shielding*)^{93 94}. Finalmente, el comportamiento biomecánico de las placas de reconstrucción en alguna de las ovejas investigadas no fue óptimo, tal vez por problemas en su aplicación o por las cambiantes condiciones de masticación que las ovejas presentan con relación a los seres humanos.

Con todo, las características de la matriz autóloga de albúmina de oveja mantienen la favorable consideración que ya teníamos en otros experimentos en los que utilizamos sangre humana. El tamaño de sus poros (150-300 μm) y su velocidad de degradación son apropiados para la osteogénesis y a la estabilidad biomecánica del segmento a reparar. De estas dos variables, dependerán las características reométricas de la matriz, pues cuanto mayores sean el tamaño de poro y la velocidad de degradación, menor será el compromiso en la integridad biomecánica y estructural antes de la completa sustitución por hueso neoformado.⁹⁵

En el presente trabajo, la información proporcionada por las tomografías computarizadas nos permite aventurar tres conclusiones. En las ovejas control (sólo injertadas con la matriz de albúmina) la formación ósea progresa desde los extremos de la osteotomía hacia el centro del defecto, (confirmado histológicamente) y su evolución está

condicionada por el tiempo de injerto del scaffold. Esta observación parece razonable y se puede justificar por la existencia de un cierto grado de inducción sobre las células huésped (nativas de la oveja) promovida por el scaffold. Una tercera observación que las pruebas de imagen nos brindaron, en nuestra opinión más inesperada, es que la neoformación ósea alcanza mayor expresión en la superficie lingual que en la vestibular y progresa en la dirección basal-alveolar. Tal vez la manipulación quirúrgica, la presencia de la placa de reconstrucción y los problemas locales derivados de los tornillos de osteosíntesis puedan justificar este comportamiento en la reparación del defecto. Asimismo, la proximidad con el espacio bucal pueda añadir que la exposición a la contaminación de la flora oral comprometiera la neoformación y eso justificase el eje basal-alveolar de la regeneración.

Finalmente, como se demostró en estudios anteriores *in vitro* e *in vivo*^{82 83 84} los osteoblastos pueden crecer y mantener su actividad cuando son cultivados en este novedoso scaffold fabricado a partir de la albúmina plasmática, sin observarse ningún tipo de reacción inflamatoria a nivel macroscópico o histológico. Este scaffold actúa como una matriz extracelular temporal, permitiendo la osteoconducción desde los bordes del hueso mandibular remanente, como puede ser observado en el grupo Control. Asimismo, este scaffold presenta una adecuada tasa de degradación, pareja a la velocidad de formación del nuevo hueso^{82 83 84} como se puede concluir basándonos en las escasas trazas de scaffold no degradado observadas en los injertos, las cuales son inversamente proporcionales al nivel de osificación.

En líneas generales parece que el papel de los scaffolds descelularizados está ganando peso en los últimos años. En la regeneración periodontal algunos autores han observado como la policaprolactona sin componente celular es capaz de facilitar la regeneración periodontal *in vivo*.⁹⁵

En esta misma línea, el grupo de Sándor⁹⁶, históricamente caracterizado por el empleo de células osteoprogenitoras y factores de crecimiento en sus técnicas reconstructivas, publicó en el año 2016 un trabajo que evalúa la capacidad reparativa en defectos críticos de calota de diversas cerámicas, utilizando como control comparativo el hueso autólogo. Si bien los resultados regenerativos del hueso autólogo son superiores, remarcan la capacidad de osteoinducción que acompaña a estas matrices acelulares.

6.3 EL CONSTRUCTO: CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA DIFERENCIADAS EN VITRO Y SU MATRIZ

Siguiendo el modelo de trabajos previos, nuestra primera intención fue el empleo de células obtenidas a partir de pequeños fragmentos del hueso mandibular de las ovejas experimentales. Este objetivo no fue posible, por lo que optamos por la utilización de células mesenquimales obtenidas por punción de la cresta iliaca de las ovejas.

Estas células, tras su cultivo se adherían al plástico del recipiente, mostrando una típica morfología fibroblástica con prolongaciones y un menor tamaño que sus homólogas de origen humano, tal y como otros autores habían señalado.⁹⁷

Siguiendo los criterios establecidos por Dominici M, y cols⁷² las células mesenquimales de médula ósea humanas deben expresar al menos los marcadores de superficie celular CD73, CD90 y CD105. Sin embargo, esta información puede no ser extrapolable a las células mesenquimales de la médula ósea de las ovejas debido a la disponibilidad limitada de anticuerpos específicos para estos animales.

Además, cuando se usan anticuerpos humanos, la ausencia de expresión de dichos marcadores de superficie celular debe interpretarse con precaución. Se ha informado que el patrón de expresión de antígeno de las células mesenquimales de médula ósea obtenidas en la oveja, es positivo para CD44 y CD105 antihumano y negativo para anticuerpos CD45 anti-ovino⁹⁸. Con las limitaciones reflejadas en el material y método, nuestros resultados al respecto apuntan hacia que, el perfil de antígeno de superficie celular de las células mesenquimales de médula ósea de oveja es similar al que expresan las células de origen humano.

Los valores obtenidos con el micro-CT en las muestras de las ovejas del presente estudio, ponen en evidencia que existe una mayor capacidad de neoformación y de mineralización ósea en aquellos especímenes que fueron injertados con células, con relación a los que sólo se les reconstruyó con matriz acelular. Pero esta observación sólo es verdadera cuando el tiempo de injerto fue de 32 semanas.

En todo caso, y de manera general el hueso neoformado con los injertos, siempre era “diferente” (menos mineralizado, y con peor organización trabecular) que el hueso nativo o residente de la oveja.

Diecisiete años antes de nuestro trabajo, otros autores⁹⁹, empleando el mismo modelo animal (8 ovejas) y generando defectos segmentarios mandibulares de 35mm de

diámetro mayor, llegaron a la conclusión de que la utilización de un constructo elaborado con células diferenciadas obtenidas por punción de la cresta ilíaca y una matriz pirolizada de hueso bovino posibilitaba una neoformación ósea.

En este trabajo los estudios histológicos seriados evidenciaron la presencia de hueso neoformado en el 34,4% de las preparaciones analizadas, cuando el constructo estaba configurado para células y matriz y sólo del 10,4% cuando solo estaba elaborado por el injerto óseo homólogo.

Pero lo más interesante del trabajo de estos autores es la observación, coincidente con nuestros resultados, de que en las ovejas en las que se emplearon células osteoproducidas, la neoformación ósea estaba presente en el centro del defecto.

Por lo tanto, aunque se ha descrito previamente que la presencia de MSCs o células osteoprogenitoras en un scaffold podía mejorar la reparación ósea^{100 101 102}. El presente estudio demuestra que el scaffold sérico es capaz de reparar defectos segmentarios mandibulares en ovejas, cuando se combina con osteoblastos diferenciados del mismo animal.^{82 83 84}. Aunque el potencial osteogénico de las BM-MSCs ha sido demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*¹⁰³, el papel específico de las MSCs implantadas durante la neoformación de hueso generado mediante ingeniería tisular es aún incierto.

Tres puntos fundamentales pueden haber contribuido a la formación ósea en nuestro modelo:

- Diferenciación de las BM-MSCs hacia células osteogénicas (que han sido pre-diferenciadas *in vitro* hacia una línea osteogénica).
- La bien conocida “sustitución paulatina”, que incluye tanto al proceso de resorción como al de aposición, con migración de las células nativas hacia el interior del scaffold.
- Secreción de factores de crecimiento por las BM-MSCs que reclutan células nativas hacia la zona del defecto^{104 105 106}. Además, las BM-MSCs pueden sobrevivir en la zona mandibular reparada hasta 32 semanas tras el trasplante.⁹⁴

Sobre la base del trabajo de Chanchareonsook et al¹⁰⁷, podemos aproximar que en el momento actual están recogidos en la literatura 32 trabajos (Fig. 62) que evalúan la reconstrucción de defectos segmentarios mandibulares en animales de gran tamaño (perros, monos, ovejas, minicerdos) con técnicas de ingeniería tisular. La mayoría de ellos utilizaban cerámicas (hidroxiapatita coralina, hidroxiapatita sintética, fosfato tricálcico) o

hueso alogénico, como soporte tridimensional basándose en sus propiedades mecánicas. El mayor número de fracasos en la regeneración ósea se obtuvo con matrices de hueso alogénico, colágeno bovino y ácidos poliglicólico, y poliláctico. Estos últimos están desaconsejados en la ingeniería tisular ósea. Las principales fuentes celulares empleadas fueron células mesenquimales autólogas de médula ósea.

Reconstrucción mandibular con IT en animales grandes

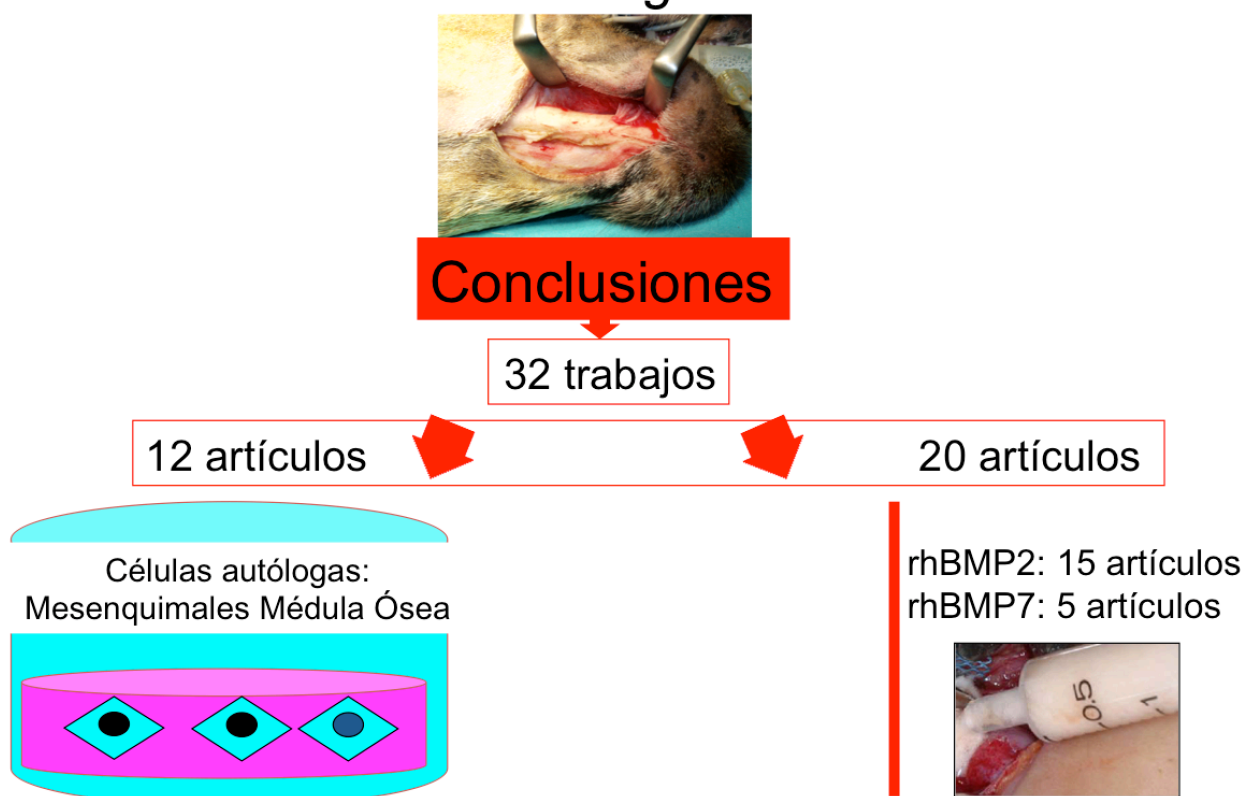


Fig. 62: Resumen de los trabajos publicados donde se evalúan defectos segmentarios en animales de gran tamaño (Modificado de Chanchareonsook et al)

Algunos de los animales injertados presentaron una excesiva formación ósea, por lo cual la restauración del contorno mandibular no fue óptima, pese a haberse alcanzado una unión satisfactoria de los fragmentos. Una estimulación mecánica subóptima del hueso neoformado probablemente impide un remodelado satisfactorio debido a un efecto de transferencia de cargas (stress shielding). La presencia de una placa de reconstrucción ósea muy gruesa así como del soporte fotopolimérico del scaffold han podido provocar la transmisión de las cargas funcionales a través de la placa, eludiendo la zona de la cirugía. Los investigadores han demostrado que la mandíbula no es inmune a la transferencia de

cargas¹⁰⁸ por lo cual se debería aplicar un mejor procedimiento de fijación o un incremento de la fuerza del scaffold con el fin de superar esta limitación.

En el presente trabajo, la información proporcionada por las tomografías computarizadas y la histología nos permite aventurar tres conclusiones. En las ovejas control (sólo injertadas con matriz acelular) la formación ósea progresa desde los extremos de la osteotomía hacia el centro del defecto, (confirmada histológicamente) y su evolución está condicionada por el tiempo de injerto del scaffold. Esta observación parece razonable y se puede justificar por la existencia de un cierto grado de inducción sobre las células huésped (nativas de la oveja) promovida por el scaffold. Una tercera observación que las pruebas de imagen nos brindaron, en nuestra opinión más inesperada, es que la neoformación ósea alcanza mayor expresión en la superficie lingual que en la vestibular y progresa en la dirección basal-alveolar. Tal vez la manipulación quirúrgica, la presencia de la placa de reconstrucción y los problemas locales derivados de los tornillos de osteosíntesis puedan justificar este comportamiento en la reparación del defecto. En las ovejas del grupo experimental (injertadas con una matriz y células diferenciadas) la formación ósea incorpora a los procesos anteriores una capacidad incrementada de neoformación que además afecta a la parte central del defecto y se reconoce entre los poros del scaffold.

6.4 LA INGENIERÍA TISULAR ÓSEA PARA LA RECONSTRUCCIÓN MANDIBULAR Y SU APLICACIÓN CLÍNICA

El primer trabajo que aplicó procedimientos de ingeniería tisular para la reconstrucción de los defectos segmentarios mandibulares en humanos se publicó en el año 2004 en la revista Lancet.¹⁰⁹ En el año 2006 se publicitó otro estudio similar.¹¹⁰ En ellos se combinaba la utilización de colgajos pediculados con técnicas de ingeniería tisular utilizando proteínas morfogenéticas recombinantes humanas (rhBMPs-2). Se pretendía la reconstrucción diferida de dos enfermos oncológicos con una novedosa técnica, que sin embargo no rindió los frutos deseados. (Fig. 63)

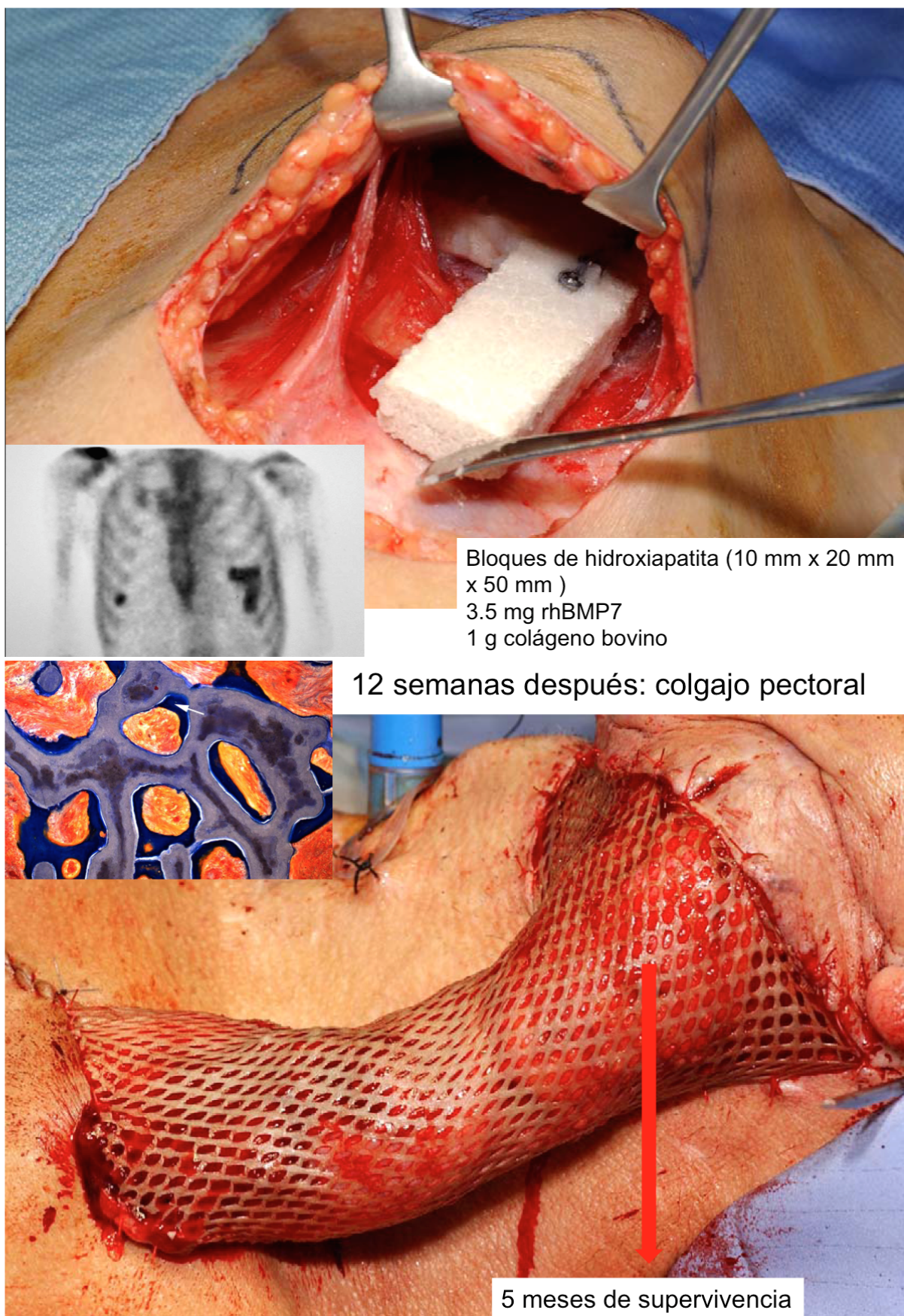


Fig. 63: Reconstrucción mandibular en un paciente oncológico mediante colgajo pectoral y bloques de hidroxiapatita (modificado de Heliotis et al).

Ulteriormente, Herford y Boyne emplearon por primera vez rhBMPs-2 transportadas en esponjas de colágeno en una malla de titanio, para la reconstrucción de defectos segmentarios mandibulares en humanos.³⁷ Su serie de casos, 11 enfermos, era sorprendente e incluía a pacientes con diferentes patologías óseas de naturaleza benigna. Según los autores, en todos los enfermos se alcanzó una regeneración ósea. Curiosamente cuatro años después los mismos autores difunden un trabajo sobre reconstrucción mandibular realizada con I.T.O. (BMPs-2) en monos (*Rhesus Macaque*), en el que modifican alguno de los procedimientos empleados.¹¹¹

En 2013, el grupo finlandés de Wolff emplearon una combinación de 10 millones de células osteoformadoras obtenidas mediante cultivo in vitro a partir del tejido adiposo (grasa abdominal, 200 ml) junto a 12 mgr de rhBMP-2 para reconstruir un defecto segmentario del frente anterior mandibular generado tras el tratamiento de un ameloblastoma multirecidivante.¹¹² Como matriz emplearon fosfato tricálcico, (matriz clave para este grupo de investigación finlandés) en una malla de titanio y placas de reconstrucción. La malla de titanio fue individualizada a partir de modelos obtenidos mediante impresora 3D. El paciente tratado pudo ser rehabilitado ulteriormente mediante implantes dentales. (Fig. 64)

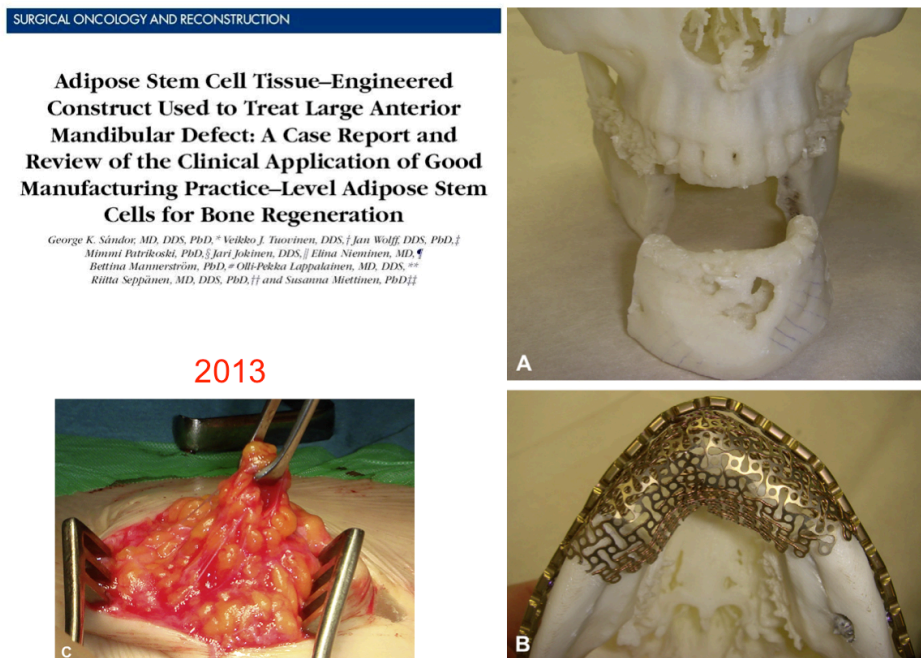


Fig. 64: Reconstrucción de la sínfisis mandibular mediante malla de titanio, matriz de fosfato tricálcico y células osteoformadoras obtenidas del tejido graso y placa de reconstrucción (Wolff et al., 2013).

En el año 2014, el mismo grupo investigador documentó una serie de 13 enfermos (la serie más larga, de las hasta ahora divulgadas) con diferentes defectos óseos craneofaciales en los que empleando similares procedimientos de I.T.O. lograban la reconstrucción del defecto a tratar en 10 pacientes.¹¹³

Sorprende que a pesar de obtener tan prometedores resultados este grupo de investigación finlandés publicara en el año 2016 un trabajo con el que pretende evaluar la capacidad de regeneración ósea promovida por el fosfato tricálcico (en gránulos) en defectos críticos de calota de conejos de Nueva Zelanda (1,5 mm, bicorticales) reconociendo su potencial de osteoformación, aunque cuantificándolo como de “menor capacidad” que el hueso autólogo.¹¹⁴

Profundizando sobre la revisión de la literatura efectuada por Chanchareonsook et al.¹⁰⁷ podemos establecer que para el uso clínico en humanos, todos los autores han utilizado células osteodiferenciadas o factores de crecimiento. De los 12 enfermos en los que se emplearon células osteoprogenitoras se recogió un sólo fracaso. En 17 pacientes en los que se utilizó rhBMP-2 también se obtuvo un fracaso. El mayor porcentaje de fracasos observados fue con el empleo de BMP xenogénica (4 fracasos en seis pacientes) seguido de rhBMP-7 (dos fracasos en 9 enfermos). Por tanto, y en nuestra opinión, el nivel de evidencia que el momento actual ofrece la ingeniería tisular ósea para la reconstrucción mandibular es bajo. Se han divulgado procedimientos técnicos muy dispares, en un reducido grupo de pacientes y como ya dejamos entrever por autores que ulteriormente a su empleo clínico realizaron estudios experimentales en animales, o “modifican” las condiciones técnicas de una metodología con la que supuestamente obtuvieron buenos resultados.

La aplicación clínica de nuestro procedimiento podría ser limitada debido al tiempo necesario para aumentar el número de células cultivadas. Esta consideración es importante para aquellos pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello pero no para aquellos que muestran otras patologías como pseudoartrosis (secundaria a fracturas, infecciones específicas u osteonecrosis química o física), ameloblastomas u otros tumores odontogénicos benignos que requieren tratamiento mediante mandibulectomías segmentarias, así como un alto número de pacientes que necesitan injertos óseos para realizar un tratamiento con implantes dentales. En cualquier caso, este

procedimiento podría ser aplicable en cualquier paciente que necesite una reconstrucción mandibular secundaria.

6.5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Todo el trabajo preclínico del grupo investigador centrado sobre la utilización de una matriz autóloga sembrada por células diferenciadas, tanto en animales de pequeño como de gran tamaño ^{73 74 82 83 84}, ha posibilitado la reciente publicación de los resultados de este procedimiento en el tratamiento de pacientes con quistes de los maxilares. ⁶⁸

En este ensayo clínico (Eudra CT 2010-024246-30 y NCT01389661) realizado por los cirujanos del Hospital Universitario Río Ortega y por los especialistas del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid, utilizando un constructo similar al del presente trabajo (BioMax: células procedentes del hueso alveolar) en nueve pacientes para la reparación de lesiones quísticas en los maxilares (quistes radiculares, no infectados), se pudo constatar mediante tomografía computarizada (Osirix software, v.3.7.1). que a los siete meses del injerto la formación ósea en los defectos era favorable.

Un paso final en el desarrollo futuro de la línea de investigación será el desarrollo de un nuevo ensayo clínico por parte de los investigadores de Valladolid, Gijón y Oviedo que analice el comportamiento clínico del producto para el tratamiento de pacientes con quistes de los maxilares. En esta nueva línea se pretende emplear células alogénicas diferenciadas de médula ósea sembradas en la misma matriz proteica de origen sanguíneo de origen no autólogo.

7. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se ha podido desarrollar un producto con capacidad osteoformadora utilizando células mesenquimales de médula ósea de oveja, diferenciadas sobre una matriz de albúmina derivada del plasma del mismo animal. Este objetivo no se alcanzó utilizando células procedentes de fragmentos óseos de los maxilares de las ovejas.
2. El fenotipo de las células mesenquimales procedentes de las ovejas parece similar al presente en las células mesenquimales de la médula ósea de origen humano.
3. Mediante la tecnología CAD-CAM fue posible la fabricación preoperatoria de moldes del producto investigado, para la reconstrucción de los defectos segmentarios mandibulares engendrados en las ovejas, así como la fabricación de camisas de soporte para los mismos.
4. Radiográficamente la restauración ósea completa del defecto segmentario se alcanzó en 6 ovejas (46,15% del total): dos ovejas del grupo control (sin células) y cuatro ovejas del grupo experimental (con células).
5. La tomografía computarizada evidenció que la reparación completa del defecto segmentario está condicionada por el tiempo de injerto. En el 83,3% de los animales sólo se alcanzó con tiempos de injerto de 32 semanas. En la única oveja en la que se alcanzó una restitución completa a las 12 semanas del injerto el material aplicado llevaba células diferenciadas.
6. Histológicamente se demostró la formación de hueso en el defecto segmentario, su progresiva mineralización al prolongarse el tiempo de injerto y la reabsorción sincrónica de la matriz investigada. La principal diferencia histológica entre el grupo control y el experimental, reconocible en algunas muestras, era la presencia de áreas de hueso neoformado en íntimo contacto con la matriz proteica.
7. Al comparar el hueso neoformado con el hueso nativo (residente de la oveja) mediante micro-CT se pudo objetivar que era mucho más inmaduro en el grupo control, pero bastante parecido en el grupo experimental, aunque menos mineralizado.

8. Al análisis mediante micro-CT de las diferencias en el hueso neoformado entre las ovejas control y las ovejas experimentales se constató que sólo existían a partir de las 32 semanas de injerto. El hueso de las ovejas experimentales tenía un mayor grado de mineralización, mayor volumen relativo de hueso nuevo, un mayor número de trabéculas, con menor separación y mayor grosor, que el hueso de las ovejas control.

8. BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ European Commission. "Consultation Document". Need for a legislative framework for human tissue engineering and tissue engineered products. En: http://ec.europa.eu/health/files/advtherapies/docs/st09756_en.pdf [29 Septiembre 2011]
- ² Skalak R, Fox CF (1988) Tissue engineering. Liss, New York
- ³ Meyer U. The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective. In: Meyer U, Handschel J, Wiesmann PH, Meyer T, eds. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009:5-12. doi:10.1007/978-3-540-77755-7_1.
- ⁴ Green WTJ. Articular cartilage repair. Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin Orthop Relat Res*. 1977;(124):237-250.
- ⁵ Yannas I V, Burke JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res*. 1980;14(1):65-81. doi:10.1002/jbm.820140108.
- ⁶ Yannas I V, Burke JF, Gordon PL, Huang C, Rubenstein RH. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res*. 1980;14(2):107-132. doi:10.1002/jbm.820140203.
- ⁷ Dagalakis N, Flink J, Stasikelis P, Burke JF, Yannas I V. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. *J Biomed Mater Res*. 1980;14(4):511-528. doi:10.1002/jbm.820140417.
- ⁸ Burke JF, Yannas I V, Quinby WC, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*. 1981;194(4):413-428.
- ⁹ Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-926.
- ¹⁰ 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.
- ¹¹ Sivayoham E, Saunders R, Derby B, Woolford T. Current concepts and advances in the application of tissue engineering in otorhinolaryngology and head and neck surgery. *J Laryngol Otol*. 2013;127(2):114-120. doi:10.1017/S0022215112002642.
- ¹² Cilento BG, Freeman MR, Schneck FX, Retik AB, Atala A. Phenotypic and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro. *J Urol* 1994;152:665-70
- ¹³ Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration and units in evolution. *Cell* 2000;100:157-68
- ¹⁴ McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997;276:66-71
- ¹⁵ Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7

-
- ¹⁶ Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008;26(1):101-106.
- ¹⁷ Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007;100:1249–60
- ¹⁸ Zhang S, Wang D, Estrov Z, Raj S, Willerson JT, Yeh ET. Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation* 2004;110:3803–7
- ¹⁹ In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003;102:548–9
- ²⁰ Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. In: Mahowald AP ed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Chicago: National Academy of Sciences, 2003;100:5807–12
- ²¹ Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528–30
- ²² Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999;283:534–7
- ²³ Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Oct;(367 Suppl):S68-83.
- ²⁴ Meyer U, Wiesmann H-P, Berr K, Kubler NR, Handschel J. Cell-based bone reconstruction therapies-principles of clinical approaches. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21(6):899-906.
- ²⁵ Becerra J, Andrades JA, Santamaría J a., Cifuentes M, Guerado E. Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería tisular. *Med Clin (Barc).* 2001;116(1):23-34.
- ²⁶ Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Bodnar MS et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet* 2004;13:727–39
- ²⁷ 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.
- ²⁸ 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.

-
- ²⁹ 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.
- ³⁰ Soucacos PN, Johnson EO, Babis G. An update on recent advances in bone regeneration. *Injury*. 2008 Sep;39 Suppl 2:S1-4.
- ³¹ 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.
- ³² 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.
- ³³ Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*. 1971;50(6):1392-1406.
- ³⁴ 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.
- ³⁵ Katagiri T, Ikeda T, Wozney M, Rosen IIV. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Stimulates Osteoblastic Maturation and Inhibits Myogenic Differentiation In Vitro. 1991;113(3):681-687.
- ³⁶ Boyne PJ. Animal studies of the application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. *Bone* 1996;19 (Suppl):83S-92S.
- ³⁷ 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.
- ³⁸ Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Novel starch-based scaffolds for bone tissue engineering: cytotoxicity, cell culture, and protein expression. *Tissue Eng*. 2004;10(3-4):465-474.
- ³⁹ Meyer U, Joos U, Wiesmann HP. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part I. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33(4):325-332.
- ⁴⁰ Kim HJ, Kim U-J, Vunjak-Novakovic G, Min B-H, Kaplan DL. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials*. 2005;26(21):4442-4452.
- ⁴¹ 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.
- ⁴² 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.

-
- ⁴³ 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.
- ⁴⁴ Donati D, Zolezzi C, Tomba P, Viganò A. Bone grafting: historical and conceptual review, starting with an old manuscript by Vittorio Putti. *Acta Orthop*. 2007;78(December):19-25.
- ⁴⁵ De Boer H H. The history of bone grafts. *Clin Orthop* 1988; (226): 293-8
- ⁴⁶ Putti V. I trapianti ossei. *Arch Ortop* 1912; 29: 294-334.
- ⁴⁷ Peltier L F. Bone-graft surgery. *Clin Orthop* 1996; (324): 5- 12.
- ⁴⁸ Inclan A The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg* 1942 ; 24: 81-96.
- ⁴⁹ Wilson P D. Experiences with a bone bank. *Ann Surg* 1947; 126: 932-46.
- ⁵⁰ Glicenstein J. Histoire de la reconstruction osseuse. *Ann Chir Plast Esthét* 2000; 45: 171-4 .
- ⁵¹ Drosse I, Volkmer E, Capanna R, Biase PD, Mutschler W, Schieker M. Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach. *Injury*. 2008;39(SUPPL.2).
- ⁵² 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.
- ⁵³ 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.
- ⁵⁴ Allori AC, Sailon 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.
- ⁵⁵ 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.
- ⁵⁶ 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.
- ⁵⁷ Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986;(205):299-308.

-
- ⁵⁸ 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.
- ⁵⁹ Acero J, Guerra B, Picon M. Cirugía reconstructiva en cáncer de cabeza y cuello. En Sanchez-Aniceto G (Ed.). Estado del arte del tratamiento quirúrgico del cáncer de cabeza y cuello. Madrid: You&Us 2013;p45-68.
- ⁶⁰ Pirgousis P, Eberle N, Fernandez R. Reoperative mandibular reconstruction. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2011;23(1):153-60.
- ⁶¹ Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res.* 2014;9(1):18.
- ⁶² LeGeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, LeGeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2003; Mar;14(3):201-9.
- ⁶³ Sivayoham E, Saunders R, Derby B, Woolford T. Current concepts and advances in the application of tissue engineering in otorhinolaryngology and head and neck surgery. *J Laryngol Otol.* 2013;127(2):114-120. doi:10.1017/S0022215112002642.
- ⁶⁴ Tatara AM, Shah SR, Demian N, et al. Reconstruction of large mandibular defects using autologous tissues generated from in vivo bioreactors. *Acta Biomater.* 2016;45:72-84. doi:10.1016/j.actbio.2016.09.013.
- ⁶⁵ Warnke PH, Wiltfang J, Springer I, et al. Man as living bioreactor: Fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials.* 2006;27(17):3163-3167. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.050.
- ⁶⁶ Meana A, García E, García V, Jorcano JL, del Río M, Larcher F, Duarte B, Holguin A, inventors; Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias, assignee, 2008 Oct 9. Method for preparing three-dimensional structures for tissue engineering. Spanish patent WO2008/119855.
- ⁶⁷ De la Peña, Regeneración ósea mandibular con células osteogénicas sembradas en una matriz proteica obtenida a partir de albúmina plasmática: estudio de ingeniería tisular ósea en ratas inmunoincompetentes. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid, 2014
- ⁶⁸ Redondo LM, García V, Peral B, Verrier A, Becerra J, Sánchez A, García-Sancho J. Repair of maxillary cystic bone defects with mesenchymal stem cells seeded on a cross-linked serum scaffold. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017 Nov 16. pii: S1010-5182(17)30378-5.
- ⁶⁹ Shah SR, Young S, Goldman JL, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG. A composite critical-size rabbit mandibular defect for evaluation of craniofacial tissue regeneration. *Nat Protoc.* 2016;11(10):1989-2009.

-
- ⁷⁰ Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010 , relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos Texto pertinente a efectos del EEE. OJ L 276, 20.10.2010, p. 33–79 (BG, ES, CS, DA, DE, ET, EL, EN, FR, IT, LV, LT, HU, MT, NL, PL, PT, RO, SK, SL, FI, SV)
- ⁷¹ España. Real Decreto 53/2013, de 1 de Febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, 8 de Febrero de 2013, num. 34, pp. 11370-11421.
- ⁷² Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
- ⁷³ Megias Barrera J, Garcia-Consuegra L, Novoa A, Costilla S, Junquera S, Ascani G. Histological and radiological evaluation of subcutaneous implants in mouse of a 3D-printable material (Fulcure 720) and experimental application in mandibular reconstruction. *J Stomatol oral Maxillofac Surg*. November 2017.
- ⁷⁴ Megías Barrera, J. Reparación de mandibulectomías segmentarias en ovejas mediante soportes de FullCure y matriz de albúmina autóloga fabricados con tecnología CAD-CAM: Evaluación histológica y radiológica. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, 2017.
- ⁷⁵ Shegarfi H, Reikeras O. Review article: bone transplantation and immune response. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2009;17(2):206-211.
- ⁷⁶ Tommasi G, Perni S, Prokopovich P. An Injectable Hydrogel as Bone Graft Material with Added Antimicrobial Properties. *Tissue Eng Part A*. 2016;22(11-12):862-872.
- ⁷⁷ Pape HC, Evans A, Kobbe P. Autologous bone graft: properties and techniques. *J Orthop Trauma*. 2010;24 Suppl 1:S36-40.
- ⁷⁸ Murphy S V, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol*. 2014;32(8):773-785.
- ⁷⁹ Hansen LA, Boss GR. Use of live animals in the curricula of U.S. medical schools: survey results from 2001. *Acad Med*. 2002;77(11):1147-1149.
- ⁸⁰ Piedrahita JA, Williams JK. Animal Models in Tissue Engineering. Part I. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017;23(11):641-642. doi:10.1089/ten.TEC.2017.0402.
- ⁸¹ Piedrahita JA, Williams JK. (*) Animal Models in Tissue Engineering. Part II. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017;23(12):827-828. doi:10.1089/ten.TEC.2017.0458.
- ⁸² Gallego L, Junquera L, Garcia E, et al. Repair of rat mandibular bone defects by alveolar osteoblasts in a novel plasma-derived albumin scaffold. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(4):1179-1187.

-
- ⁸³ Gallego L, Junquera L, Meana A, Alvarez-Viejo M, Fresno M. Ectopic bone formation from mandibular osteoblasts cultured in a novel human serum-derived albumin scaffold. *J Biomater Appl.* 2010;25(4):367-381.
- ⁸⁴ Gallego L, Junquera L, Meana A, Garcia E, Garcia V. Three-dimensional culture of mandibular human osteoblasts on a novel albumin scaffold: growth, proliferation, and differentiation potential in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25(4):699-705.
- ⁸⁵ Kol A, Arzi B, Athanasiou KA, et al. Companion animals: Translational scientist's new best friends. *Sci Transl Med.* 2015;7(308):308ps21.
- ⁸⁶ Lammens J, Laumen A, Delport H, Vanlauwe J. The Pentaconcept in skeletal tissue engineering. A combined approach for the repair of bone defects. *Acta Orthop Belg.* 2012;78(5):569-573.
- ⁸⁷ Lammens J, Marechal M, Geris L, et al. Warning About the Use of Critical-Size Defects for the Translational Study of Bone Repair: Analysis of a Sheep Tibial Model. *Tissue Eng Part C Methods.* 2017;23(11):694-699.
- ⁸⁸ Bansal S, Keah NM, Neuwirth AL, et al. Large Animal Models of Meniscus Repair and Regeneration: A Systematic Review of the State of the Field. *Tissue Eng Part C Methods.* 2017;23(11):661-672.
- ⁸⁹ Kon E, Muraglia A, Corsi A, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res.* 2000;49(3):328-337.
- ⁹⁰ Bensaid W, Oudina K, Viateau V, et al. De novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model. *Tissue Eng.* 2005;11(5-6):814-824.
- ⁹¹ Mastrogiacomo M, Corsi A, Francioso E, et al. Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate. *Tissue Eng.* 2006;12(5):1261-1273.
- ⁹² Yuan J, Cui L, Zhang WJ, Liu W, Cao Y. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials.* 2007;28(6):1005-1013.
- ⁹³ Wang G, Yang H, Li M, Lu S, Chen X, Cai X. The use of silk fibroin/hydroxyapatite composite co-cultured with rabbit bone-marrow stromal cells in the healing of a segmental bone defect. *J Bone Joint Surg Br.* 2010;92(2):320-325.
- ⁹⁴ Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, et al. Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone.* 2005;37(5):688-698.
- ⁹⁵ Farag A, Hashimi SM, Vaquette C, Bartold PM, Hutmacher DW, Ivanovski S. The effect of decellularized tissue engineered constructs on periodontal regeneration. *J Clin Periodontol.* March 2018.

-
- ⁹⁶ Lappalainen O-P, Karhula SS, Haapea M, et al. Micro-CT Analysis of Bone Healing in Rabbit Calvarial Critical-Sized Defects with Solid Bioactive Glass, Tricalcium Phosphate Granules or Autogenous Bone. *J Oral Maxillofac Res.* 2016;7(2):e4.
- ⁹⁷ Rentsch C, Hess R, Rentsch B, et al. Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010;46(7):624-634.
- ⁹⁸ Mrugala D, Bony C, Neves N, et al. Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(3):288-295.
- ⁹⁹ Schliephake H, Knebel JW, Aufderheide M, Tauscher M. Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30(6):531-537. doi:10.1054/ijom.2001.0164.
- ¹⁰⁰ Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1998;16(2):155–162.
- ¹⁰¹ Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 1998;80(7):985–996.
- ¹⁰² Schliephake H, Knebel JW, Aufderheide M, Tauscher M. Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30(6):531–537.
- ¹⁰³ Zong C, Xue D, Yuan W, et al. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *Eur Cell Mater.* 2010;20:109–120.
- ¹⁰⁴ Toriumi DM, Kotler HS, Luxenberg DP, Holtrop ME, Wang EA. Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991;117(10):1101–1112.
- ¹⁰⁵ Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol.* 1994;161(1):218–228.
- ¹⁰⁶ Hoshino M, Egi T, Terai H, et al. Repair of long intercalated rib defects in dogs using recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res A.* 2009;90(2):514–521.
- ¹⁰⁷ Chanchareonsook N, Junker R, Jongpaiboonkit L, Jansen JA. Tissue-Engineered Mandibular Bone Reconstruction for Continuity Defects: A Systematic Approach to the Literature. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(2):147-162.

- ¹⁰⁸ Throckmorton GS, Ellis E 3rd, Winkler AJ, Dechow PC. Bone strain following application of a rigid bone plate: an in vitro study in human mandibles. *J Oral Maxillofac Surg*. 1992;50(10):1064-1066.
- ¹⁰⁹ Warnke PH, Springer ING, Wiltfang J, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet (London, England)*. 2004;364(9436):766-770.
- ¹¹⁰ Heliotis M, Lavery KM, Ripamonti U, Tsiridis E, di Silvio L. Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006;35(3):265-269.
- ¹¹¹ Herford AS, Lu M, Buxton AN, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 combined with an osteoconductive bulking agent for mandibular continuity defects in nonhuman primates. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012;70(3):703-716.
- ¹¹² Wolff J, Sandor GK, Miettinen A, et al. GMP-level adipose stem cells combined with computer-aided manufacturing to reconstruct mandibular ameloblastoma resection defects: Experience with three cases. *Ann Maxillofac Surg*. 2013;3(2):114-125.
- ¹¹³ Sandor GK, Numminen J, Wolff J, et al. Adipose stem cells used to reconstruct 13 cases with cranio-maxillofacial hard-tissue defects. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(4):530-540.
- ¹¹⁴ Lappalainen O-P, Karhula S, Haapea M, et al. Bone healing in rabbit calvarial critical-sized defects filled with stem cells and growth factors combined with granular or solid scaffolds. *Childs Nerv Syst*. 2016;32(4):681-688.