

Universidad de Granada

**TESIS DOCTORAL**



**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE MUCOSA  
ORAL DE ESPESOR COMPLETO OBTENIDA  
MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR**

Luis Miguel Capitán Cañadas

Departamento de Histología

Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial

# Caracterización Histológica de Mucosa Oral de Espesor Completo obtenida mediante Ingeniería Tisular

Memoria que presenta Luis Miguel Capitán Cañadas para optar al grado de Doctor en  
Medicina. Noviembre de 2006.

## DIRECTORES

Dr. D. Antonio Campos Muñoz  
Dr. D. Miguel Alaminos Mingorance  
Dr. D. Dario Sánchez López

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA  
SERVICIO DE CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL

FACULTAD DE MEDICINA - HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**



Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III, FIS 04/1306 y por la Fundación Progreso y Salud CM0011/2005.

El artículo “Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering” cuyos autores son: M.C. Sánchez Quevedo, M. Alaminos, L.M. Capitán, G. Moreu, I. Garzón, P.V. Crespo y A. Campos) y que forma parte de la presente Tesis Doctoral, cuenta con aceptación (noviembre 2006) para su publicación en la revista internacional ***Histology and Histopathology***.

LOS PROFESORES, Dr. D. ANTONIO CAMPOS MUÑOZ, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, Dr. D. MIGUEL ALAMINOS MINGORANCE, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y Dr. D. DARIO SÁNCHEZ LÓPEZ, ESPECIALISTA EN CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL DEL SERVICIO DE CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que presenta Luis Miguel Capitán Cañadas al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, cuyo título es ***Caracterización Histológica de Mucosa Oral de Espesor Completo obtenida mediante Ingeniería Tisular***, ha sido realizada bajo nuestra dirección, siendo fiel expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan meritorias que le hacen acreedor del título de DOCTOR, siempre y cuando así lo considere el citado tribunal.

Granada, noviembre de 2006

Antonio Campos Muñoz

Miguel Alaminos Mingorance

Dario Sánchez López

**A mi abuelo, Fermín Capitán.**

## **AGRADECIMIENTOS**

No es fácil tener tanto que agradecer y sólo unas cuantas líneas para que dichos agradecimientos queden reflejados, así que de entrada pido disculpas y doy gracias a todos aquellos que aun sin aparecer en estas líneas habeis contribuido a hacerlas realidad.

Quiero comenzar por mi profesor y maestro D. Antonio Campos Muñoz, ya que sin su incondicional apoyo desde hace ya unos cuantos años, su inagotable ilusión y su fe en mí, este trabajo sólo sería una idea de esas que siempre tienes rondando en la cabeza pero que nunca llegas a materializar. A mi tutor y amigo Antonio Alaminos, por que nunca he escuchado un no de su boca y por que esta Tesis es tan mia como suya. A mi querido compañero y amigo Dario Sánchez, por su tiempo y por sus enseñanzas. A mi familia, que siempre ha estado a mi lado, que me ha apoyado de manera constante y desinteresada y gracias a la cual, y de esto no tengo duda, he llegado a ser lo que hoy soy. A mi mujer Ino, por su tiempo, por su paciencia, por el amor que pone en todo lo que hace y por sus maravillosos cafés que de tantas horas de sueño me han librado. A mi fiel amigo y compañero Alfonso Labrot, juntos empezamos éste y muchos otros proyectos y juntos espero finalizarlos. A mis compañeros y amigos del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial de Granada, gracias a todos ellos estoy empezando a dar mis primeros pasos en el mundo de la cirugía. A todos vosotros, nombrados o no en este parrafo quiero dedicaros con todo mi cariño y afecto el presente trabajo. Gracias.

# **TESIS DOCTORAL**

Luis Miguel Capitán Cañadas

# ÍNDICE GENERAL

## INTRODUCCIÓN

1. Histología de la Mucosa Oral
  - 1.1 Epitelio de la Mucosa Oral
    - 1.1.1 Epitelio Plano Estratificado Queratinizado
    - 1.1.2 Epitelio Plano Estratificado Paraqueratinizado
    - 1.1.3 Epitelio Plano Estratificado no Queratinizado
  - 1.2 Membrana Basal de la Mucosa Oral
  - 1.3 Lámina Propia o Corion de la Mucosa Oral
2. Técnicas Quirúrgicas para la reconstrucción de los defectos de la Mucosa Oral y sus anexos
  - 2.1 Cicatrización-Granulación por segunda intención
  - 2.2 Sutura Primaria Directa
  - 2.3 Injertos Dermo-Epidérmicos
  - 2.4 Sustitutos Biocompatibles
  - 2.5 Colgajos Locales y Locorreregionales
    - 2.5.1. Colgajo de Músculo Pectoral Mayor
    - 2.5.2. Colgajo de Músculo Esternocleidomastoideo
    - 2.5.3. Colgajo de Músculo Temporal
    - 2.5.4. Colgajo Palatino
    - 2.5.5. Colgajo de Músculo Masetero
    - 2.5.6. Colgajo de Músculo Buccinador
    - 2.5.7. Colgajo de Paquete Graso Bucal o Bola de Bichat
  - 2.6 Colgajos Libres de Reconstrucción Microquirúrgica
    - 2.6.1. Colgajo Radial
    - 2.6.1. Colgajo del Sistema Subescapular
    - 2.6.1. Colgajo de Cresta Iliaca
    - 2.6.1. Colgajo de Peroné

## OBJETIVOS

## MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de muestras de Mucosa Oral Humana
2. Desarrollo de Cultivos Primarios de Fibroblastos y Queratinocitos de Mucosa Oral
3. Subcultivos de las células procedentes de Cultivos Primarios de Mucosa Oral
4. Congelación de Células
5. Evaluación de la Viabilidad Celular mediante Microanálisis por Energía Dispersiva de Rayos X
  - 5.1. Adhesión de las células al soporte
  - 5.2. Eliminación del medio extracelular
  - 5.3. Criofijación de las muestras
  - 5.4. Criodesecación de las muestras
  - 5.5. Montaje y Recubrimiento de las muestras
  - 5.6. Instrumentación, parámetros analíticos y condiciones de observación
  - 5.7. Observación de las muestras
  - 5.8. Método de cuantificación para microanálisis por energía dispersiva de rayos X con microscopía electrónica de barrido
  - 5.9. Patrones y Curvas de Calibración

6. Desarrollo de Matrices Extracelulares de sustitutos del corion de la Mucosa Oral
  - 6.1 Fabricación de geles de agarosa al 2%
  - 6.2 Fabricación de geles de fibrina humana
  - 6.3 Fabricación de geles de agarosa más fibrina
  - 6.4 Fabricación de geles de colágeno
7. Construcción de sustitutos de Mucosa Oral mediante Ingeniería Tisular
8. Evaluación microscópica de los sustitutos de Mucosa Oral

## **RESULTADOS**

1. Generación de cultivos primarios de Queratinocitos y fibroblastos de mucosa oral.
2. Evaluación de la viabilidad celular mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X.
3. Matrices extracelulares
4. Sustitutos de mucosa oral obtenidos mediante Ingeniería Tisular.
5. Evaluación microscópica.

## **DISCUSIÓN**

## **CONCLUSIONES**

## **BIBLIOGRAFÍA**

## **ANEXOS**

# **INTRODUCCIÓN**

El desarrollo experimentado por la Cirugía Reconstructiva de Cabeza y Cuello así como por la Cirugía Oral y sus subespecialidades, ha permitido la obtención de excelentes resultados funcionales y estéticos en la resolución de las patologías objeto de dichas especialidades (Shah y Patel, 2004); (Shaw et al., 2005). Aun así persisten problemas asociados a las actuales técnicas quirúrgicas; entre ellos queremos destacar los relacionados con la mucosa oral y con las estructuras adyacentes a la misma (Shah y Patel, 2004). Numerosos procesos congénitos, infecciosos, preneoplásicos, neoplásicos, degenerativos, traumáticos o iatrogénicos hacen necesario, en determinadas ocasiones, llevar a cabo actuaciones quirúrgicas sobre la mucosa oral, por lo que ésta adquiere un protagonismo muy significativo en numerosos procesos terapéuticos, conservadores y restauradores de la Cirugía de Cabeza y Cuello, de la Cirugía Oral, de la Odontología y de parte de sus distintas subespecialidades.

El déficit de mucosa oral secundario a determinados actos quirúrgicos programados, traumatismos u otras situaciones clínicas, supone un auténtico problema a la hora de obtener una adecuada cobertura que repare el defecto originado de manera idónea sin añadir morbilidad al acto terapéutico (López de Atalaya 1996). Frente a la necesidad de reparar dichos defectos, han surgido diversas soluciones con diferentes grados de complejidad: cicatrización-granulación de zonas cruentas por segunda intención (Clark y Singer, 2000), uso de injertos autólogos cutáneos de espesor parcial o completo (Petruzzelli et al., 1992) (Butler, 2001), interposición de materiales biocompatibles (Paolantonio, 2002), empleo de colgajos locales y locorregionales (Urken, 1995a) e incluso, utilización de técnicas de reconstrucción microquirúrgica (Rosenthal et al., 2004) con empleo de colgajos libres para la reparación de grandes defectos.

A pesar de este importante arsenal terapéutico, se mantiene la necesidad de encontrar sustitutos hísticos funcional, anatómica y estéticamente similares a los de la zona receptora, así como soluciones que reduzcan la morbilidad asociada a la obtención de tejidos en las zonas donantes (Garfein et al., 2003).

La Ingeniería Tisular nace en 1933 con la implantación de células tumorales de ratón sobre una membrana de polímero biocompatible (Fuchs et al., 2001). Posteriormente los importantes trabajos de Rheinwald y Green (Rheinwald y Green, 1975) logran perfeccionar las técnicas de cultivo epitelial *in vitro*. Todo ello, junto con el posterior desarrollo de las técnicas de obtención de materiales hísticos biocompatibles liderada por los sustitutos dermo-epidérmicos (Bannasch et al., 2005), han supuesto una revolución en la búsqueda de material autólogo capaz de sustituir el tejido primario dañado. Definimos la Ingeniería Tisular como aquella área de la biotecnología

encargada de construir equivalentes tisulares orgánicos capaces de restaurar, sustituir o incrementar las actividades anatómicas y funcionales de los propios tejidos y órganos dañados (Langer y Vacanti,1993); (Nerem y Sambanis, 1995); (Campos, 2004).

En el año 1987 el profesor Fung, propone el término de Ingeniería Tisular durante una reunión anual de la National Science Foundation de Estados Unidos. Durante la década de los 90 el auge de la Ingeniería Tisular se ve favorecido por el empuje de numerosas empresas que ven en los nuevos productos desarrollados una potencialidad comercial fácilmente aplicable al ámbito clínico. En la actualidad tras años de investigación son más de 80 las empresas dedicadas exclusivamente a la Ingeniería Tisular (Lysaght, 2001), la inversión económica de la última década superó los 3.5 billones americanos de dólares y la tendencia es claramente progresiva. El empleo clínico de epidermis y cartílago viene siendo una constante, desde su aprobación por la FDA, como constructos derivados de la Ingeniería Tisular, válidos para su empleo sanitario; en el momento actual no son más de seis [piel, vasos sanguíneos, válvulas cardiacas, hueso, cartílago y músculo] los constructos que cuentan con aprobación para su uso terapéutico y sobre los cuales se lleva a cabo una mayor labor investigadora y de desarrollo, con la consecuente inversión económica asociada. Desde el punto de vista clínico, son dos los principales factores que justifican el rápido y necesario desarrollo de esta disciplina:

- a) La necesidad de encontrar sustitutos orgánicos adecuados que permitan disminuir las listas de espera de transplante de órganos, derivadas de la escasez de donantes.
- b) La utilización de prótesis autólogas permite eliminar el riesgo de rechazo del injerto así como la utilización de inmunosupresores tras su implantación (Sher et al, 1983).

Como toda ciencia en fase de expansión, existen numerosos problemas aún no solventados, entre los que sobresalen la viabilidad de los cultivos celulares, la obtención de un tejido de soporte adecuado que permita su empleo en la clínica y el reto de obtener constructos viables con aporte vascular intrínseco (Langer, 1993); (Campos, 2004). A pesar de esto, los resultados alcanzados en la obtención de mucosa oral artificial mediante técnicas de Ingeniería Tisular (Izumi, 2004); (Iida, 2005), parecen esperanzadores en relación su aplicación clínica estandarizada (Lauer, 2001); (Izumi 2003).

La presente Tesis Doctoral tiene por objeto construir mucosa oral artificial con las máximas características ortotípicas, destinada a su uso terapéutico y utilizando para ello distintos protocolos de Ingeniería Tisular. Antes de detallar los objetivos de la misma y de exponer el material y la metodología a utilizar, describiremos en sucesivos apartados de este capítulo introductorio las características histológicas de la mucosa

oral ortotópica y las principales técnicas quirúrgicas empleadas en la actualidad para solventar situaciones clínicas que cursen con déficit de mucosa oral y que podrían beneficiarse de la utilización de mucosa oral artificial.

## 1. HISTOLOGÍA DE LA MUCOSA ORAL

La mucosa oral es el epitelio de revestimiento del interior de la cavidad bucal. Se encuentra en la transición entre la piel y la mucosa del tracto digestivo, presentando por tanto características intermedias entre ambas (Ferraris y Campos, 2002). Dicha localización anatómica confiere a la mucosa oral una serie de características que la diferencian del resto de superficies de revestimiento epitelial y la convierten en interesante objeto de estudio. La sustitución de técnicas clásicas de estudio, como la microscopía óptica por técnicas de microscopía electrónica, tanto de barrido como de transmisión, así como el uso de técnicas inmunohistoquímicas, enzimáticas y genéticas nos permiten un conocimiento muy exacto de la estructura, composición y características de la mucosa oral.

Como toda mucosa se encuentra formada por una superficie epitelial de revestimiento y una lámina propia subyacente formada por tejido conectivo. En función de su localización en diferentes zonas de la cavidad oral, podemos encontrar tres tipos funcionales de mucosa oral: mucosa de revestimiento, mucosa masticatoria y mucosa sensitiva o especializada (Arvidson et al., 1988). Dado que cada una cumple una función determinada, sus características estructurales e histológicas varían:

**Mucosa de Revestimiento:** Tapiza la región geniana, ambos surcos vestíbulo-labiales, surco glosopélvico y paladar blando. Al no intervenir de manera directa en el acto masticatorio presenta una superficie epitelial plana estratificada no queratinizada. Gracias a la capa submucosa conformada por tejido conectivo obtiene relativa movilidad.

**Mucosa Masticatoria:** Se encuentra tapizando paladar duro y encía. Soporta de manera directa la mecánica masticatoria por lo que el epitelio plano estratificado que lo constituye se encuentra queratinizado. Su capa basal es de tipo fibroso y no presenta submucosa conectiva de manera que se adhiere firmemente a las estructuras óseas y periósticas que recubre.

**Mucosa Sensitiva:** No hace referencia a una zona anatómica concreta. Se trata de las papilas linguales situadas en la superficie dorsal de toda la lengua, en cuyo interior podemos encontrar distintos tipos de corpúsculos sensitivos.

Como hemos comentado la mucosa oral presenta dos capas estructurales, bien diferenciadas entre si, tanto desde el punto de vista embriológico como histológico.

La capa superficial o epitelial es de origen ectodérmico, por el contrario la capa subyacente denominada lámina propia o corion, formada por tejido conectivo, procede de células de la cresta neural (origen ectomesenquimatoso). Ambas se encuentran conectadas por la membrana basal. La interrelación entre ambas capas es de tipo ondulado, podemos encontrar papilas coriales o prolongaciones de tejido conectivo en el espesor epitelial interdigitadas con las crestas epiteliales o evaginaciones epiteliales hacia el interior del tejido conectivo (Figura 1). Esta disposición en dientes de sierra facilita la nutrición epitelial al existir una mayor proximidad entre el tejido conjuntivo vascular y el epitelio avascular (Sperry y Wassersug, 1976); (Takahashi y Hashimoto, 1985).

## 1.1 EPITELIO DE LA MUCOSA ORAL

El epitelio de la mucosa oral es de tipo plano o de tipo pavimentoso estratificado. Puede presentarse queratinizado, paraqueratinizado o no Queratinizado (Figura 2).

### 1.1.1 EPITELIO PLANO ESTRATIFICADO QUERATINIZADO.

Se encuentra compuesto por dos tipos de poblaciones celulares: intrínseca y extrínseca. La población intrínseca supone el 90 % de la población celular del epitelio y se encuentra constituida en su totalidad por queratinocitos. Será la población que vamos a describir pormenorizadamente, ya que es la población que constituirá la mayor parte de la mucosa oral a obtener mediante Ingeniería Tisular. La población extrínseca es la constituida por elementos celulares ajenos al epitelio, el 9% de dicha población lo forman células permanentes o residentes, el 1% restante lo conforman células transitorias. Las células permanentes son denominadas células dendríticas o células claras y agrupan: melanocitos, células de Merckel y células de Langerhans. La población transitoria está constituida por linfocitos, granulocitos y linfocitos (Ferraris y Campos, 2002).

Durante su evolución y especialización los queratinocitos migran desde las capas más basales del epitelio hacia la superficie donde se transforman en elementos queratinizados con ausencia de núcleo. Los queratinocitos del epitelio bucal se disponen formando cuatro estratos: Germinativo o Basal, Espinoso, Granuloso y Corneo (Figura 3).

Estrato germinativo o Basal. Se encuentra formado por una única capa de células cúbicas o cilíndricas. Su núcleo es ovalado y posee un citoplasma intensamente basófilo, a expensas de una rica actividad sintetizadora de proteínas por parte de los ribosomas y del Retículo Endoplasmático Rugoso [RER]. Son responsables de la formación de la lámina basal, que forma parte de la membrana basal. Los

queratinocitos del estrato basal se conectan con la membrana basal a través de hemidesmosomas y puntos de anclaje, entre los que se establecen uniones intercelulares tipo desmosoma, uniones ocluyentes o uniones comunicantes [nexos]. Es en este estrato basal donde comienza el proceso de renovación epitelial. Inmersos en el estrato germinativo podemos encontrar melanocitos, células de Merckel y células de Langerhans.

Los queratinocitos basales se caracterizan, principalmente, porque expresan integrinas de superficie en mayor medida que las células del resto de los estratos (Aumailley y Krieg, 1996). Dichas integrinas son receptores de adhesión de la superficie celular. Cada una de estas integrinas se compone de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ . Dichas subunidades son glicoproteínas transmembranas que enlazan, por una parte, el citoesqueleto y, por otra, la matriz extracelular. Las integrinas  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_4$  son las más frecuentemente expresadas por los queratinocitos del estrato basal; la última de las citadas se localiza principalmente en la membrana celular basal, las dos primeras podemos encontrarlas en el resto de la superficie celular. Las integrinas juegan un importante papel en la migración celular y, por tanto, en la organización espacial de los epitelios, tanto en su desarrollo como en el proceso de reparación de heridas. Mediante el empleo de técnicas de citoquímica enzimática, se observa que los queratinocitos de la capa basal expresan succinodeshidrogenasa de manera muy intensa, lo que indica una gran actividad metabólica (Holbrook, 1994).

Estrato Espinoso. Se encuentra formado por varias hileras de queratinocitos. Son células poligonales de núcleo redondo, más o menos pequeño, de cromatina laxa, con citoplasma ligeramente basófilo y caracterizadas por presentar abundantes desmosomas constituidos por haces de tonofilamentos. Dichos tonofilamentos son heteropolímeros constituidos por una subunidad de queratina ácida y una subunidad de queratina básica. La expresión de los pares de citoqueratinas o queratinas de los tonofilamentos varía en el epitelio que recubre las distintas regiones de la cavidad bucal. Los citoplasmas celulares presentan gran cantidad de inclusiones de glucógeno. Las características descritas son clásicas de células en vías de queratinización. En el estrato espinoso al igual que en el basal podemos encontrar células de Merckel y células de Langerhans.

Estrato granuloso. Se encuentra constituido por dos o tres capas de células aplanadas o escamosas con un pequeño núcleo de cromatina densa. Su citoplasma se encuentra lleno de gránulos de queratohialina intensamente basófilos. Los tonofilamentos son muy abundantes y están en íntima relación con los gránulos de queratohialina, los cuales en el proceso de queratinización se encargan de formar la sustancia interfibrilar

que une los haces de tonofilamentos. Los tonofilamentos de queratina en la capa granular son más fosforilados y poseen más puentes disulfuros que en los estratos basal y espinoso. En el estrato granuloso encontramos unos organoides característicos de los epitelios queratinizados: los cuerpos de Odland o queratinosomas (Ferraris y Campos, 2002). Son pequeños organoides ovalados, de 100 a 300 nm de diámetro que se localizan en las células granulosas más profundas e incluso en algunas células del estrato espinoso. Presentan una membrana trilaminar y un interior con láminas paralelas electrodensas y electrolúcidas de naturaleza lipídica. Contienen fosfatasa ácida. Parecen originarse en el aparato de Golgi, desde el que emigrarían hacia la periferia, para unirse a la membrana plasmática del queratinocito. Dado que los queratinosomas no están presentes en epitelios no queratinizados, se deduce que deben cumplir algún papel en el proceso de queratinización.

Entre los péptidos segregados por los queratinocitos granulosos, encontramos la calprotectina, la cual tiene un importante papel antimicótico y antibacteriano (Eversole, 1972)

En la capa de células granulosas comienza la degeneración del núcleo y del resto de organoides celulares. A diferencia de las células basales y espinosas, en las que las enzimas lisosómicas, como la fosfatasa ácida, sólo se expresan en forma de escasos agregados granulares, en la capa granulosa las técnicas histoquímicas revelan una coloración muy difundida de las enzimas lisosómicas. En el estrato granuloso se da, por tanto, un gran contraste poco explicado desde el punto de vista biológico: la célula granulosa desarrolla una importante actividad sintética de proteínas de envoltura, lípidos, receptores y antígenos relacionados con la queratinización y, al mismo tiempo, en cinco o seis horas se prepara para la desestructuración de sus organelas y su núcleo hasta convertirse en un elemento del estrato córneo. Fisher tras realizar varios experimentos con roedores, propuso al protooncogen *c-fos* como eje central de este proceso (Fisher et al., 1991).

Estrato córneo: Se encuentra constituido por células planas sin núcleo evidente y con citoplasma fuertemente acidófilo. Estas células, libres de gránulos de queratohialina, reciben la denominación de corneocitos. Ultraestructuralmente las células de las capas cornificadas carecen de organoides y están compuestas por filamentos agrupados de modo compacto, que se forman a partir de los tonofilamentos de queratina, recubiertos por la proteína básica del gránulo de queratohialina. El citoplasma puede estar completamente ocupado por haces de filamentos (corneocitos densos) o ocupado de manera parcial (corneocitos claros).

La célula queratinizada se transforma en una escama compacta y deshidratada, que cubre un área de superficie mayor que la de la célula basal de la cual se formó, además se encuentra íntimamente adosada a las escamas adyacentes. La membrana plasmática es más gruesa que en las células de las capas más profundas. Existe una modificación de las uniones intercelulares, lo que facilita la descamación celular; los desmosomas desaparecen y encontramos que las células se unen a través de interdigitaciones. Entre dichas interdigitaciones, encontramos un material denso de morfología lenticular procedente de la degeneración de los desmosomas y que recibe la denominación de "squasmosoma" (Ferraris y Campos, 2002). Las células superficiales del epitelio bucal plano estratificado queratinizado normalmente no forman un verdadero estrato córneo. A diferencia de lo que ocurre en la piel estas células pueden ser eliminadas individualmente sin que se forme una membrana que actúe como una barrera impermeable. A nivel de la mucosa masticatoria la capa superficial o córnea alcanza un espesor menor de 150  $\mu\text{m}$ , mientras que el espesor mínimo en la piel fina corresponde aproximadamente a 10  $\mu\text{m}$ .

El proceso de queratinización no es sinónimo de cornificación. Si bien la queratina (proteína azufrada) es el componente principal del estrato córneo, éste posee otras sustancias, que varían según el tipo de sistema queratinizante. En este sentido se ha descrito la síntesis por parte de los queratinocitos de las proteínas *involucrina* y *filagrina* que participarían respectivamente en el engrosamiento de la cara interna de la membrana celular y en la configuración de la matriz en la que se lleva a cabo el ensamblaje de los haces de queratina. El incremento en la síntesis de filagrina coincide con la disminución en la síntesis de involucrina (Holbrook, 1994).

En la superficie celular de los queratinocitos existen cinco patrones relacionados con el grado de diferenciación de los mismos:

- Patrón celular tipo I. Se caracteriza por la presencia de *microvillis* como marcador de diferenciación superficial.
- Patrón celular tipo II: Se caracteriza por la presencia de microplicas. Las microplicas son crestas superficiales originadas por pliegues de membrana de longitud variable y de curso básicamente rectilíneo.
- Patrón celular tipo III: Se caracteriza por presentar microplicas curvas, de idéntico carácter a las del tipo II, si bien morfológicamente ofrecen un patrón curvilíneo en los extremos terminales.
- Patrón celular tipo IV. Denominado también patrón reticular, se caracteriza por presentar microplicas circulares, ramificadas y concluyentes.

· Patrón celular tipo V. Se caracteriza por presentar un patrón poroso en su superficie, relacionado con la existencia de oquedades claramente definidas y delimitadas por una moderada sobreelevación marginal.

Los queratinocitos más indiferenciados, que se corresponden con los de los estratos basal y espinoso, presentan en su superficie *microvillis* (patrón I). A medida que los queratinocitos se diferencian aparecen microplicas en su superficie (patrones II, III y IV). El patrón poroso (patrón V) se observa en la superficie al final del proceso de diferenciación. Aunque en cualquier superficie epitelial de la cavidad bucal pueden encontrarse los cinco tipos de patrones, en el epitelio plano estratificado queratinizado predomina el patrón V, y en menor medida, los patrones II, III y IV. Estas estructuras superficiales de los queratinocitos poseen dos funciones básicas: canalizar el flujo de las secreciones en la superficie celular y favorecer la cohesión intercelular una vez que desaparecen los desmosomas (Ferraris y Campos 2002).

#### 1.1.2 EPITELIO PLANO ESTRATIFICADO PARAQUERATINIZADO.

Únicamente presenta diferencias con el epitelio queratinizado a nivel del estrato corneo. Los elementos celulares de esta capa conservan sus núcleos y algunas organelas parcialmente lisadas. Se trata de núcleos picnóticos con cromatina densa. Son células acidófilas, aunque su tinción no es tan intensa como en epitelios queratinizados, lo que es indicativo de un metabolismo celular escaso. Presentan gran cantidad de tonofilamentos. A nivel de los espacios intercelulares podemos encontrar hendiduras que delimitan las áreas celulares. Aunque a nivel de su superficie podemos encontrar los cinco patrones descritos anteriormente con el microscopio electrónico de barrido, predominan los patrones con microplicas II, III y IV. Los queratinocitos del epitelio paraqueratinizado expresan calprotectina (Eversole, 1972) en casi todos los estratos, excepto en el basal y en las primeras hileras del espinoso.

#### 1.1.3 EPITELIO PLANO ESTRATIFICADO NO QUERATINIZADO.

La principal diferencia con el epitelio queratinizado es que no genera la capa córnea superficial y que carece de estrato granuloso. En el epitelio no queratinizado encontramos capa basal, capa intermedia y capa superficial. La capa basal no presenta diferencias respecto a lo descrito anteriormente.

Capa intermedia: Constituida por células poliédricas con núcleo redondo de cromatina laxa y citoplasma poco basófilo con gran cantidad de glucógeno. Las células se encuentran asociadas mediante desmosomas. Las uniones celulares predominantes son las interdigitaciones.

Capa superficial: Constituida por células planas, nucleadas, de aspecto normal (no presentan cambios nucleares ni citoplasmáticos) que terminan descamándose al igual que lo hacen las escamas corneales. Predominan los patrones con microplacas II, III y IV, aunque también podemos encontrar los cinco patrones descritos. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se observa la expresión de calprotectina por parte de los queratinocitos en todos los estratos, excepto en el basal y en las primeras hileras del espinoso.

## 1.2 MEMBRANA BASAL DE LA MUCOSA ORAL

La separación entre el epitelio de la mucosa oral y el tejido conjuntivo se lleva a cabo mediante la membrana basal. Se trata de una banda acelular homogénea y estrecha constituida por dos regiones bien diferenciadas: la lámina basal, sintetizada por las células epiteliales y la lámina reticular, elaborada por células del tejido conectivo.

Lámina basal: Se divide en dos estratos, lámina lúcida y lámina densa. Cada una presenta un grosor de 50nm. Ultraestructuralmente se trata de una red tridimensional constituida por multitud de cordones de aproximadamente 3,4 nm de grosor.

En la lámina lucida se detectan laminina y entactina de manera preferente; en la lámina densa encontramos colágeno tipo IV, fibronectina y heparansulfato, también denominado perlacán, por su aspecto en forma de collar de perlas tras su visualización con microscopía electrónica (Murdoch y Iozzo, 1993). La laminina se asocia por una parte a las integrinas ubicadas en la superficie de la célula epitelial (receptores de laminina) y por otra, al colágeno tipo IV y al heparánsulfato, contribuyendo a la fijación de la célula a la lámina basal. La laminina tipo I es la que encontramos presente en casi la práctica totalidad de láminas basales, también es posible encontrar laminina tipo V.

Lámina reticular: Constituida por fibras inmersas en una matriz de glucosaminoglicanos. Su espesor varía en función del grado de fricción al que se encuentre sometido el epitelio suprayacente, siendo más gruesa en epitelios queratinizados. Podemos encontrar fibras de anclaje y fibras reticulares.

Fibras de anclaje: Son fibras de colágeno tipo VII que se disponen formando bucles, que se originan y finalizan a nivel de la lámina densa, en pequeñas áreas subyacentes de colágeno tipo IV denominadas placas de anclaje.

Fibras reticulares: Son fibras de reticulita (colágeno tipo III) que se distribuyen paralelamente al epitelio entre las fibras de anclaje. La fibronectina contribuye a fijar la lámina reticular a la lámina basal.

La membrana basal posee varias funciones. Principalmente la de ser una estructura de fijación entre el epitelio y el tejido conectivo. Sirve como guía para la migración

celular en la reepitelización de heridas y contribuye como barrera al sistema defensivo del organismo. En la cavidad bucal la membrana basal presenta algunas características especiales: presenta mayor grosor en epitelios no queratinizados y con la edad va disminuyendo progresivamente de espesor. La alteración de la configuración molecular de esta estructura explica numerosos procesos que afectan involucrados en la patología de la mucosa bucal (Flug y Kopf-Maier, 1995).

### 1.3 LÁMINA PROPIA O CORION DE LA MUCOSA ORAL

Es una lámina de tejido conectivo de espesor variable que confiere sostén y nutrición al epitelio. Dichas funciones se ven reforzadas por la presencia de papilas conductoras de vascularización e inervación. Estas papilas varían de longitud y anchura de acuerdo con la zona. El tejido conectivo puede ser laxo, denso o semidenso según la región. Su distribución está relacionada con las necesidades específicas de las diversas regiones de la cavidad bucal. Presenta fibroblastos, macrófagos, linfocitos, células cebadas y células plasmáticas (Ferraris y Schneider, 1977). Mediante técnicas histoquímicas, que incluyen microscopía electrónica por electrones retrodispersos podemos detectar las fosfatasas ácidas y alcalinas en los distintos subtipos de leucocitos, así como los receptores de superficie. Existe una estrecha relación entre el fibroblasto y los queratinocitos de la población epitelial suprayacente. La secreción de IL-1 del queratinocito activado estimula la proliferación y la actividad sintética del fibroblasto, y la secreción por parte de éste de prostaglandinas PGE<sub>2</sub> que estimulan la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos.

Las fibras colágenas ofrecen resistencia a las fuerzas de tracción y tensión y evitan deformaciones de la mucosa. Las fibras elásticas son las encargadas de devolver el tejido a la normalidad tras la actuación de las fuerzas de tensión. Podemos asimismo observar fibras reticulares reforzando la pared de los vasos sanguíneos.

La lámina propia se adhiere directamente al periostio o bien se dispone recubriendo la submucosa. En las zonas laterales de las papilas conectivas de la lámina propia las células basales del epitelio de revestimiento suprayacente expresan integrinas  $\alpha_3\beta_1$  a diferencia, de lo que ocurre en la zona libre o vértice de las papilas conectivas en las que la células basales del epitelio suprayacente no expresan dichas integrinas.

En la lámina propia los vasos de origen arterial forman redes capilares subepiteliales en las papilas. A nivel de la lámina propia de la mucosa bucal existe una rica inervación con terminaciones nerviosas sensoriales que recogen información sobre la percepción del dolor (nocirreceptores), la temperatura (termorreceptores) y el tacto y la presión (mecanorreceptores). Las terminaciones nocirreceptoras y termorreceptoras son terminaciones libres que se ubican, tanto en la lámina propia, bajo la lámina basal,

como entre las células del epitelio. Esta inervación aferente de la mucosa bucal procede de los pares craneales V, VII y IX.

En la lámina propia de la mucosa bucal existen fibras simpáticas eferentes que inervan vasos y glándulas salivares.

En ocasiones uniendo la mucosa oral a los tejidos subyacentes encontramos un tejido laxo que suele denominarse submucosa. La submucosa puede existir como una capa separada y bien definida, o no estar presente cuando el corion se encuentra firmemente adherido a la estructura ósea y perióstica subyacente. Hay submucosa en las zonas que requieren movilidad y que no se encuentran expuestas de manera directa al proceso masticatorio. El tejido conectivo que la conforma puede presentar un espesor y densidad variables. En esta capa podemos encontrar glándulas salivales, vasos y nervios así como tejido adiposo. A nivel de la submucosa las grandes arterias se dividen en ramas más pequeñas que penetran en la lámina propia. Las fibras nerviosas son mielínicas cuando atraviesan la submucosa, pero pierden su vaina antes de dividirse en sus arborizaciones terminales en la lámina propia (Ferraris y Campos, 2002).

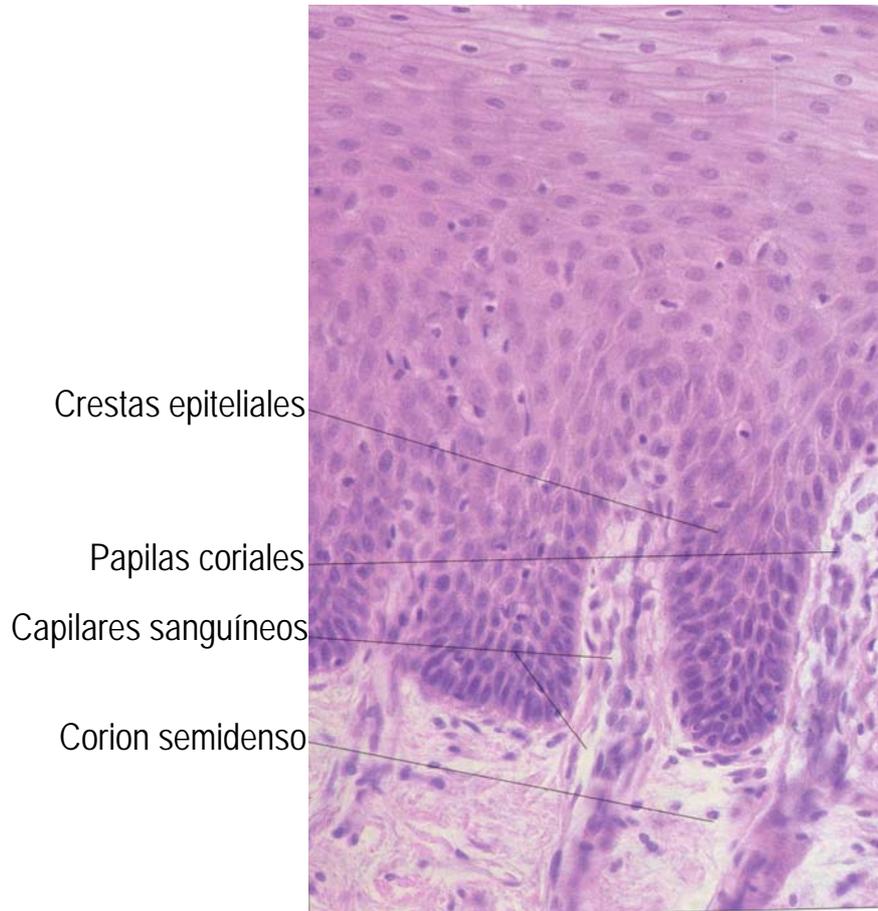


Figura 1. Mucosa bucal. (M.O. Técnica H-E). Epitelio estratificado plano no queratinizado y corion semidenso. (Imagen cortesía de Ferraris y Campos)

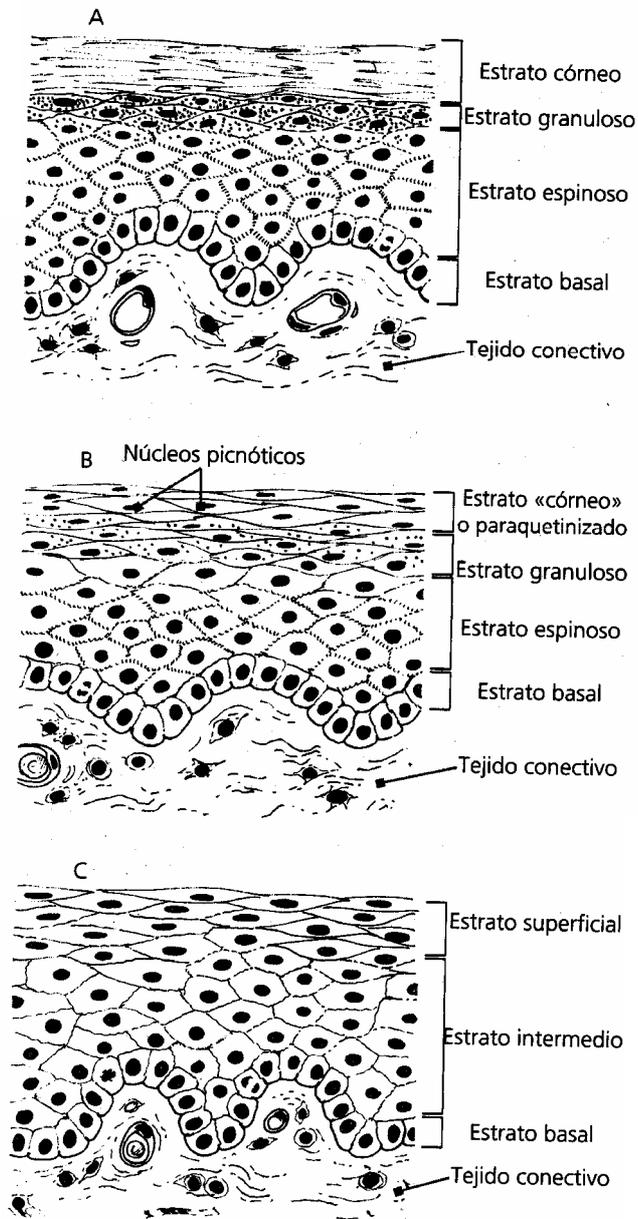


Figura 2. Esquema con los diferentes tipos de epitelios estratificados planos. A. queratinizado. B paraqueratinizado. C. no queratinizado. (Esquema cortesía de Ferraris y Campos)

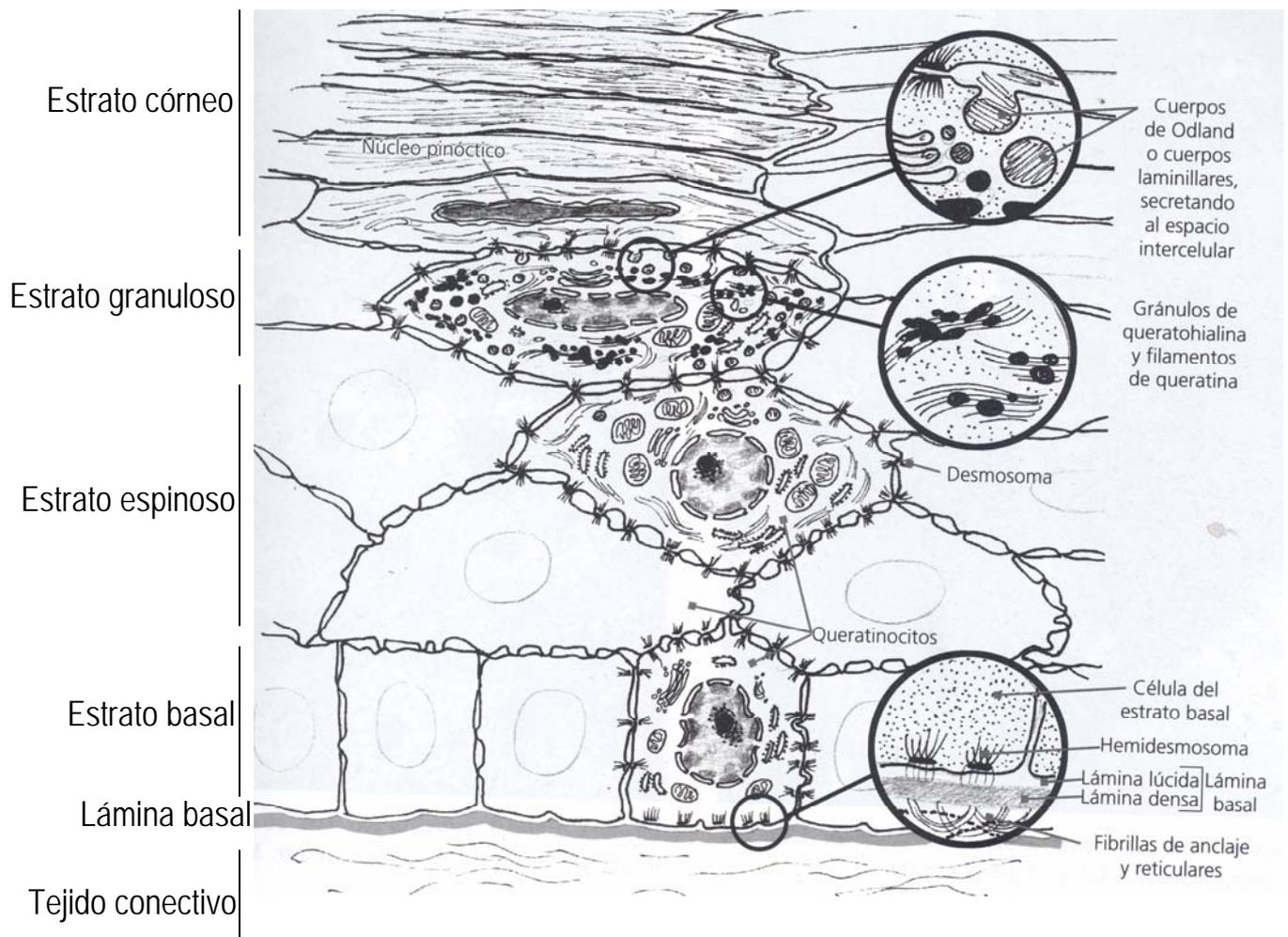


Figura 3. Esquema con la diferenciación celular en un epitelio plano estratificado queratinizado. (Esquema cortesía de Ferraris y Campos)

## **2. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS PARA LA RECONSTRUCCIÓN DE LOS DEFECTOS DE LA MUCOSA ORAL Y SUS ANEXOS**

La ausencia de tejido mucoso en la cavidad oral y sus anexos secundaria a un fenómeno traumático, a cualquier tipo de proceso histopatológico, o como consecuencia de un acto quirúrgico programado, supone en la actualidad uno de los grandes retos reconstructivos de las especialidades médico-quirúrgicas y odontológicas vinculadas con el citado territorio (Urken et al., 1995). La evolución de técnicas quirúrgicas reconstructivas en Cirugía de Cabeza y Cuello ha permitido la consecución de actos quirúrgicos de gran envergadura con resultados funcionales y estéticos más que aceptables (Sha, 2004). Lógicamente no todos los defectos de mucosa son iguales, pudiendo oscilar desde defectos aislados que afecten exclusivamente a la mucosa (Figura 4) a otros de mayor complejidad que en ocasiones se acompañan de defectos de estructuras adyacentes (músculo, hueso o incluso piel) (Figura 5). A la hora de elegir el método reconstructivo más idóneo hemos de valorar de manera metódica la extensión del defecto, los elementos involucrados en la reconstrucción del mismo, la patología que ha ocasionado dicho defecto y las características propias de cada paciente. Elegir de manera adecuada el método reconstructivo a emplear va a condicionar el pronóstico funcional, estético y en ocasiones de supervivencia del paciente (Urken et al., 1995).

En el presente apartado vamos a sintetizar las principales técnicas reconstructivas empleadas en la actualidad frente a defectos de mucosa oral de diferente cuantía y susceptibles de ser parcial o totalmente sustituidas por el empleo de mucosa oral creada mediante ingeniería tisular. Entre las citadas técnicas, destacamos: Cicatrización-granulación por segunda intención, sutura primaria directa, empleo de injertos dermo-epidérmicos, empleo de sustitutos biocompatibles, colgajos locales y locorreregionales e injertos libres vascularizados.

## 2.1 CICATRIZACIÓN-GRANULACIÓN POR SEGUNDA INTENCIÓN

Frente a defectos mucosos de escaso tamaño, de difícil acceso anatómico para su reconstrucción o sutura (ej. pared posterofaríngea) y que no comprometan a estructuras adyacentes, se puede optar por dejar que la zona cruenta cicatrice y de lugar a una granulación por segunda intención, que a la larga se constituirá en un tejido con características histológicas similares al primario (Figura 6).

El proceso de cicatrización consta de una serie de etapas dinámicas concatenadas y que involucran a mediadores solubles (mediadores de la inflamación y factores de crecimiento), elementos sanguíneos, matriz extracelular y al propio parénquima celular. En líneas generales podemos dividirlo en tres grupos secuenciales: inflamación, epitelización y formación de tejido de granulación.

**ETAPA DE INFLAMACIÓN.** Tras la pérdida de un determinado tejido, la extravasación sanguínea favorece el fenómeno de la coagulación y el agregamiento plaquetario, cuyo objetivo es el control hemostático y la generación de una matriz en la zona afecta que permita la posterior migración celular. En esta fase es fundamental el papel jugado por las *plaquetas*, encargadas de precipitar la cascada de la coagulación y de conseguir la creación de una adecuada malla de fibrina que favorezca la hemostasia y por los *neutrófilos*, que van a mantener limpio el foco de la zona dañada mediante la fagocitosis de microorganismos y partículas extrañas. Otro importante papel es el jugado por los *monocitos*, que además de favorecer la fagocitosis y el debridamiento, pasan a transformarse en *macrófagos* inflamatorios o reparativos, encargados de sintetizar y segregar factores de crecimiento [*Transforming growth factor* tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), *Platelet derived growth factor* (PDGF), TGF- $\alpha$ , *Insuline-like growth factor* tipo I (IGF-I), Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)] (Clark, 1996a), que parecen ser los mediadores en la iniciación y propagación de nuevo tejido en la zona dañada, por lo que jugarían un importante papel en la transición inflamación-reparación (Riches, 1996)

**ETAPA DE EPITELIZACIÓN.** El proceso de reepitelización de la zona dañada persigue el rápido reestablecimiento de una barrera, cuyo objetivo es evitar la morbilidad asociada a la zona cruenta expuesta. Para ello, dentro de las primeras horas se produce una migración de células epiteliales desde estructuras epiteliales residuales. Las células migradas no contienen proteínas queratinocíticas encontradas normalmente en el epitelio maduro estratificado; sin embargo si podemos observar determinados tipos de queratinas que únicamente se encuentran en queratinocitos basales del epitelio estratificado (Mansbridge y Knapp, 1987).

ETAPA DE TEJIDO DE GRANULACIÓN. El nuevo estroma o tejido de granulación, comienza a formarse a partir del cuarto día de la pérdida de tejido. Se trata de un estroma fibroso compuesto por numerosos neovasos, que constituye el andamiaje para la formación de un tejido de características histológicas similares a las del tejido primario. La cantidad y la calidad de este tejido va a depender de los factores biológicos presentes, del nivel de actividad de las células involucradas y de las características de la matriz extracelular generada. (Juliano y Haskill, 1992)

## 2.2 SUTURA PRIMARIA DIRECTA

Cuando las condiciones son favorables (resección mucosa de tamaño moderado, cercanía de los bordes cruentos, posibilidad de cierre sin tensión) una de las opciones más utilizadas es el cierre del defecto mediante sutura directa, empleando para ello material de sutura que puede ir desde seda trenzada no reabsorbible a material reabsorbible de distintas características. Con el empleo de sutura directa, se genera una herida que sigue los pasos de una cicatrización de características normales (Clark, 1996b). En numerosas ocasiones, el cierre del defecto se realiza por planos de sutura (plano muscular-plano mucoso), lo que favorece un cierre más hermético, un control más adecuado de la hemostasia y una disminución de las probabilidades de que se produzca una dehiscencia de la herida quirúrgica. Es una técnica quirúrgica sencilla, de buenos resultados y asumible siempre y cuando no se comprometa la funcionalidad y no se altere la anatomía de la zona reconstruida (Figura 7).

## 2.3 INJERTOS DERMO-EPIDÉRMICOS

Injertar es la acción de aplicar una porción de tejido vivo a una parte del cuerpo dañada o lesionada de manera que se produzca una unión orgánica. Los injertos libres son, por tanto, porciones de tejido vivo que no quedan conectadas a la zona donante, destinadas a cubrir, rellenar, conectar o dar soporte a la zona lesionada.

La indicación esencial del injerto libre es reconstruir defectos muy concretos de tejido vivo en cuanto a tamaño. Puesto que el injerto libre debe permanecer sin aporte sanguíneo hasta que los vasos de la zona receptora y el injerto se unan, éste tiene un tiempo limitado de supervivencia hasta que se establezca la vascularización del injerto y fijación del mismo, proceso que se denomina prendimiento.

Los factores que influyen en el prendimiento son los que favorecen una rápida vascularización: un adecuado lecho vascular con potencial angiogénico; una aproximación exacta que acorte la distancia que deban puentear los capilares neoformados sin obstáculos interpuestos así como una superficie de contacto

suficiente y una inmovilización que evite tensiones o pequeños movimientos (Clevers y Baker, 1997).

Para defectos de mucosa oral se utilizan injertos libres cutáneos cuando el defecto es demasiado extenso para cicatrizar por segunda intención o exista la posibilidad de producir contracturas y debilidad funcional (Chien et al., 2005). Esto sucede así en el caso de los defectos superficiales situados en la parte anterior del suelo de la boca o en la cara lateral de la porción bucal de la lengua. Aunque se suele producir un desprendimiento de las capas superficiales epidérmicas, las basales son viables y condicionan una epitelización con buenos resultados funcionales.

Los injertos pueden ser de dos tipos:

- De espesor total. Formado por epidermis y el grosor completo de la dermis.
- De espesor parcial. Formado por epidermis y una cantidad variable de dermis, pudiendo ser en función de su grosor finos (0,008-0,0012 mm), intermedios (0,012-0,018 mm) o gruesos (0,018-0,030 mm).

El injerto de piel total prende más difícilmente que el parcial, si bien aquél resiste mejor un trauma posterior. Los de grosor total suelen extraerse con bisturí y las zonas donantes son la piel preauricular, retroauricular o mastoidea, la supraclavicular y las flexuras. Las de grosor parcial se extraen con dermatomos y suelen extraerse de muslos, nalgas y brazo.

Antes de colocar el injerto es necesario realizar una cuidadosa hemostasia y desbridamiento de la zona receptora para evitar hematomas o sobreinfecciones que condicionen su fracaso. Se fijará con sutura discontinua y se aplicará una compresión para favorecer el contacto. En el injerto se realizarán pequeñas perforaciones que evacuen las posibles colecciones hemáticas que puedan formarse y que impedirían la correcta adherencia entre las superficies. Entre sus principales inconvenientes destacan el crecimiento, a nivel intraoral, de estructuras anexales y la excesiva queratinización de sus capas superficiales (Toft et al., 2000); (Chien et al., 2005).

## 2.4 SUSTITUTOS BIOCOMPATIBLES

La reciente aparición de sustitutos artificiales de dermis supone un gran avance para la cobertura de diversos defectos. Entre los más empleados destacan:

-Alloderm (Marca Registrada): Dermis acelular y criopreservada obtenida de piel de cadáver. Posee las ventajas de ser inerte, resistente y de fácil manejo. Su integración en el tejido circundante impide su migración accidental y mantiene a largo plazo el volumen obtenido. Existe una amplia experiencia en su utilización en reconstrucciones de defectos palatinos, retracciones gingivales y otras situaciones que cursen con

defectos pequeños o medianos de mucosa oral (Cole et al., 2006); (Navarro-Cuellar et al., 2004); (Clark et al., 2003).

-Integra (M.R.): Colágeno bovino y condroitinsulfatos sobre láminas de silicona (Dantzer y Brave, 2001).

Uno de los principales inconvenientes de este tipo de productos es su elevado coste.

## 2.5 COLGAJOS LOCALES Y LOCORREGIONALES

Se define colgajo local o locorregional como aquel tejido irrigado por uno o varios pedículos vasculares, de los cuales depende, y que puede ser utilizado para la reparación de defectos de distinta cuantía y localización, mediante el empleo de técnicas quirúrgicas (avance, rotación) que permiten su desplazamiento y que respetan la integridad de su aporte vascular.

Los colgajos locales y locorregionales constituyen una valiosa fuente de tejidos donantes en Cirugía Reconstructiva de Cabeza y Cuello (Urken et al., 1995). Pese al avance de la microcirugía, con la posibilidad de transferir colgajos libres vascularizados, y de técnicas reconstructivas muy refinadas, el empleo de zonas donantes locales sigue contando con numerosas indicaciones que hemos de valorar en función de la patología tratada, de las características del paciente y del defecto que pretendemos restaurar.

En el siguiente apartado repasaremos de forma resumida algunos de los más importantes colgajos locorregionales y de transferencia libre empleados en Cirugía Reconstructiva de Cabeza y Cuello, centrándonos en aquellos más utilizados actualmente en situaciones con afectación directa o indirecta de la cavidad oral y sus anexos.

### 2.5.1 COLGAJO DE MÚSCULO PECTORAL MAYOR

Se trata de un colgajo musculocutáneo descrito en 1947 por Pickerel y colaboradores (Pickerel et al., 1947) como un colgajo de rotación en defectos de pared torácica. A finales de los setenta Ariyan y Cuono (Ariyan y Cuono, 1980) reconocen el enorme potencial del colgajo pectoral mayor en la Cirugía Reconstructiva de Cabeza y Cuello.

Permite la transferencia del músculo pectoral mayor y la posibilidad así mismo de transferir un segmento de piel irrigado por ramas perforantes procedentes del músculo. El volumen de piel y tejido celular subcutáneo transferido puede igualar a la superficie muscular o ser adaptado en función del defecto a reparar. Asimismo es posible el tallado del colgajo pectoral sin incluir piel y tejido celular subcutáneo en el mismo.

Pese a tratarse de un colgajo musculocutáneo, es posible el tallado de componente óseo, bien de costilla (Cuono y Ariyan, 1980) o de esternón (Green et al., 1981), aun

así la morbilidad asociada a la técnica, el escaso componente óseo obtenido y el perfeccionamiento de otras técnicas de transferencia ósea (ej. Colgajo libre peronéo) hacen que en la actualidad prácticamente no se contemple esta posibilidad.

El colgajo pectoral permite su empleo en numerosas circunstancias: cirugía oncológica ablativa (Figura 8) (Vartanian et al., 2004), faringostomas-traqueostomas postquirúrgicos o postradioterapia (Fleischer y Khafif, 1989), reconstrucciones faringoesofágicas (Lee y Lore, 1986), secuelas postraumáticas con afectación severa de partes blandas (Ortiz Mendoza y García Arenas, 2003), recubrimiento de lechos cervicales con necrosis activa o con exposición del eje vascular (Urken y Biller, 1995a).

Entre sus ventajas hemos de destacar la facilidad de tallado del colgajo, su rica vascularización, la cantidad de piel que permite obtener, el generoso volumen tisular que oferta útil en la reparación de grandes defectos, su extenso arco de rotación, la posibilidad de tallar una doble paleta cutánea simultánea (Biller et al., 1980) o diferida (Dennis y Kashima, 1981) que permita por ejemplo su uso intra y extraoral, su buena tolerancia funcional postquirúrgica en región pectoral y la posibilidad de efectuar un cierre directo en la zona donante.

A pesar de ser un colgajo ampliamente utilizado, cuenta con una serie de desventajas, de las que enumeramos las más importantes

- a) El excesivo volumen de tejido ofertado origina muchas veces problemas funcionales, sobre todo en reconstrucción faringoesofágica y en su uso a nivel intraoral (Fabian, 1988).
- b) El retraso en la cicatrización y asentamiento del colgajo.
- c) El indeseable efecto gravitatorio sobre el mismo, que en numerosas ocasiones conlleva un excesivo descolgamiento pectoral con las consecuentes complicaciones asociadas.
- d) La denervación del colgajo que conduce a una progresiva atrofia del mismo.
- e) Necrosis. Gracias a la rica vascularización del colgajo es extraño observar una necrosis completa del mismo [1.5% (Baek et al., 1982), 2.4% (Vartanian et al., 2004), 3% (Shah, 1990) y 7% (Wilson, 1984) en las series revisadas], pero la necrosis parcial se ha descrito hasta en un 29% (Shah et al., 1990) secundaria a una rotación excesiva del pedículo vascular o a una tunelización supraclavicular insuficiente.
- f) Resultados estéticos deficientes, especialmente cuando el colgajo se emplea en mujeres.
- g) La utilización de isla cutánea intraoral en pacientes varones suele determinar un crecimiento anómalo de pelo, que suele remitir tras recibir tratamiento radioterápico postoperatorio.

h) Metaplasia de la epidermis intraoral al cabo de entre aproximadamente ocho y doce semanas (Shah, 2004) que se transforma en un epitelio estratificado no queratinizado similar al de la mucosa oral.

En cuanto a la zona donante, las complicaciones son raras, no obstante podemos observar:

a) hematomas y seromas postquirúrgicos.

b) cierres directos con excesiva tensión que pueden provocar necrosis parcial de la zona o incluso anomalías respiratorias de tipo restrictivo (Urken y Biller, 1995a).

c) La exposición de cartílago costochondral que puede ser origen de infecciones, incluidos cuadros de condritis (Weaver et al., 1982).

## 2.5.2 COLGAJO DE MÚSCULO ESTERNOCLEIDOMASTOIDEO [ECM]

Colgajo descrito inicialmente por Jiano (Urken y Biller, 1995b), y empleado como colgajo muscular, musculocutáneo (Owens, 1955) musculoperióstico (Tovi y Gittot, 1983) y osteomuscular (Conley, 1972), (Siemssen et al., 1978).

Empleado por primera vez por Jiano en 1908 para intento de reanimación facial dinámica en paciente con parálisis unilateral. Posteriormente varios autores (Dingman et al., 1969), (Hamacher, 1969) emplean el colgajo de ECM como sustituto motor del músculo masetero o para la reconstrucción de defectos complejos faciales (Owens, 1955)

Este tipo de colgajo permite el tallado del músculo ECM y de sus estructuras adyacentes. Gracias a su rica vascularización (arteria occipital, arteria auricular posterior, arteria tiroidea superior y tronco tirocervical) permite ser pediculado desde su inserción superior en mastoides o desde su inserción inferior en el cuerpo clavicular.

La capacidad de tallar el colgajo preservando su actividad motora lo hace subsidiario de emplearse en situaciones que requieran actividad funcional: reparación de parálisis faciales (Sasaki, 1980), competencia labial (O'Brien, 1970) y masticatoria (Sasaki, 1980). Hasta la fecha se ha empleado como cobertura de defectos postparotidectomía (Bugis, 1990) sin evidenciarse control de síndrome de Frey postquirúrgico (Kornblut, 1974); (Kornblut et al., 1977) y en defectos postmandibulectomía (Hill y Brown, 1978) así como en la reconstrucción de cavidad oral-orofaringe tras cirugía oncológica (Hamacher, 1969), (Tanaka et al., 2003) y en cierre de esofagostomas (Ariyan, 1979). A pesar de ser un colgajo ampliamente estudiado, su uso es en la actualidad muy limitado. La irregularidad y complejidad de su anatomía vascular unido a la dificultad de obtención de una paleta cutánea viable son dos de los principales defectos de este colgajo (Urken y Biller, 1995b). Numerosos grupos oncológicos critican su uso en

caso de metástasis linfáticas regionales y en caso de necesidad de radioterapia radical (Kiener et al., 2001). Su tamaño limita su uso a defectos pequeños y medianos (Tanaka et al., 2003). Por último reseñar el déficit estético y funcional generado tras su trasposición. (Álvarez et al., 1983)

### 2.5.3 COLGAJO DE MÚSCULO TEMPORAL

Colgajo que permite la utilización del músculo temporal y de su correspondiente fascia, fue descrito en 1898 por Golovine (Golovine, 1898) y es posiblemente uno de los primeros colgajos locorregionales empleados en reconstrucción de cabeza y cuello. Inicialmente se utilizó para la obliteración de espacios muertos tras exanteraciones orbitarias (Antonyshyn et al., 1988); (Reese y Jones, 1961); (Tessier y Krastinova, 1982) gracias a la cercanía anatómica de la zona donante y receptora. Más tarde Gillies (Gillies, 1934) introduce el uso del músculo temporal para rehabilitación dinámica de parálisis faciales. Posteriormente, ya en la década de los setenta y los ochenta, numerosos autores (May, 1985); (McKenna et al., 1991); (Edgerton et al., 1975) emplearán el colgajo temporal de manera satisfactoria con la misma finalidad, lo que junto a los trabajos de Rubin (Rubin et al., 1989); (Rubin, 1991) en reconstrucción de comisura oral consolidan al colgajo temporal como primera opción en el tratamiento rehabilitador de parálisis faciales.

Refinamientos quirúrgicos posteriores han permitido la transferencia del colgajo temporal para reconstrucción de defectos postmaxilectomía (Figura 9) (Bakamjian y Souther, 1975); (Renner et al., 1984), defectos palpebrales (Hallock, 1984) e intraorales (Lopez et al., 2002); (Smolka y Iizuka, 2005).

Asimismo el colgajo ofrece la posibilidad de servir como transportador de calota vascularizada, útil en reconstrucción de defectos óseos palatinos y orbitarios [reborde y suelo] (Parhiscar et al., 2002); (Ali et al., 2005).

Entre los inconvenientes del colgajo hemos de destacar:

- a) la imposibilidad de transferir elemento cutáneo con el mismo.
- b) presentar un arco de rotación relativamente corto que limita su empleo en reconstrucción de la zona nasolabial.
- c) generar una deformación secundaria evidente en la zona donante (Cheney, 1995).

### 2.5.4 COLGAJO PALATINO

Se trata de un colgajo mucoperiostico que permite la utilización de la mucosa y el periostio de la región del hemipaladar duro. Introducido por Millard en 1962 (Millard, 1962) y popularizado por Gullane y Arena (Gullane y Arena, 1977) para la reconstrucción de defectos mucosos posteriores de la cavidad oral.

Dado el tamaño del colgajo, su uso es bastante limitado. Permite un giro de 180° lo que favorece la reconstrucción de defectos retromolares y de fosa tonsilar (Urken y Biller, 1995c). Además, es útil en el cierre de defectos de la pared laterofaríngea (Komisar, 1985). Se ha empleado, junto a un colgajo mucoso de pared posterofaríngea, para restauración de la competencia velofaríngea (Millard y Seider, 1977) así como para la reparación de fisuras palatinas y el cierre de fístulas oroantrales (Gullane y Arena, 1985)

#### 2.5.5 COLGAJO DE MÚSCULO MASETERO

Empleado por primera vez en 1911 por Lexer y Eden (Urken et al., 1995) con fines reconstructivos, se trata de un colgajo muscular que permite exclusivamente el tallado del músculo masetero pediculado sobre la arteria maseterina, rama de la arteria maxilar interna. Utilizado principalmente para reanimación dinámica del tercio inferior facial en casos de parálisis facial congénita, postraumática o postablative. (Conway, 1958), (Rubin, 1974). En ocasiones también se emplea para reconstrucción de defectos mucosos de cavidad oral (Conley, 1978), que puede verse limitada por el tamaño del colgajo y por la presencia de la rama mandibular ascendente, que limita su transposición (Cheney y Urken, 1995). Una vez que el colgajo ha sido posicionado y cubre el defecto mucoso a reconstruir, el mismo debe ser cubierto por un injerto cutáneo de espesor parcial, si la mucosa adyacente no posibilita esta cobertura (Tiwari y Show, 1988).

#### 2.5.6 COLGAJO DE MÚSCULO BUCCINADOR

Colgajo miomucoso que permite el tallado del músculo buccinador y de la mucosa suprayacente a éste. En 1975, Kaplan (Kaplan, 1975), utiliza un colgajo de mucosa bucal para reconstrucción de paladar blando; A finales de los ochenta Maeda y colaboradores (Maeda et al., 1987) realizan posteriormente una mejora en la vascularización mucosa del colgajo de Kaplan, añadiendo fibras del músculo buccinador. Ese mismo año el colgajo miomucoso bucal es pediculado hacia el ángulo de la boca para llevar a cabo una reconstrucción parcial de labio (Rayner y Arcott, 1987). Ono y colaboradores (Ono et al., 1997) mejoran la técnica a final de los noventa, empleando el colgajo miomucoso de músculo buccinador para reconstruir defectos totales de labio inferior.

Se trata de un colgajo que permite una buena alternativa reconstructiva de defectos de tamaño moderado en el área maxilofacial (González García et al., 2005), utilizado en reconstrucción de paladar, labio inferior, lengua, suelo de la boca, defectos de tercio medio y periorbitarios (Anastassov et al., 2002), (Stofman et al., 1995). Al presentar un

arco de rotación amplio permite cubrir la mayoría de defectos homolaterales palatinos y maxilares, cruzando incluso la línea media (Anastassov et al., 2002). Asimismo el colgajo ha sido empleado para cierre de fístulas oroantrales, nasoplalatinas y orocutáneas, cobertura de injertos óseos maxilares, exposiciones mandibulares por osteorradionecrosis, exposiciones de placas de fijación, defectos de cavidad nasal y septum, defectos de pared faríngea e incompetencia velofaríngea (González García et al., 2005). En determinadas ocasiones precisa el empleo de injertos dérmicos de espesor parcial o aloinjertos para el cierre del defecto originado en la zona donante, esto unido a la limitación de tejido aportado, son posiblemente los mayores inconvenientes del colgajo buccinador (Caubet et al., 1996).

#### 2.5.7 COLGAJO DE PAQUETE GRASO BUCAL O BOLA DE BICHAT

Colgajo constituido exclusivamente por el tejido adiposo de la conocida como bola de Bichat y por la fascia que la empaqueta. Localizada por delante del espacio pterigomaxilar, puede ser empleada en reconstrucción de defectos pequeños y medianos que afecten al maxilar superior, paladar blando, a la transición paladar blando-paladar duro (Figura 10), al triángulo retromolar, a región amigdalina, pared laterofaríngea, así como en el cierre de fístulas oroantrales (Colella et al., 2004). Es conveniente emplear una cuidadosa técnica de disección que preserve íntegro su pedículo vascular, ya que la falta de vascularización conduce a un rápido proceso de atrofia (Fan et al., 2002). La metaplasia del tejido graso hacia pseudoepitelio tiene lugar entre la tercera y quinta semana postoperatoria (Alkan et al., 2003).

#### 2.6 COLGAJOS LIBRES DE RECONSTRUCCIÓN MICROQUIRÚRGICA

Se denomina colgajo libre a aquel colgajo axial cuyo pedículo se anastomosa mediante técnicas microquirúrgicas, tras sección del lugar de origen, a un nuevo pedículo próximo al defecto a cubrir (Navarro y Herencia, 2004).

Los colgajos libres han supuesto un importante avance cualitativo en la Cirugía Reconstructiva de Cabeza y Cuello de los últimos veinte años, permitiendo la consecución de cirugías oncológicas radicales con resultados estéticos y funcionales aceptables (Urken et al., 1995). Por lo general se encargan de cubrir defectos amplios que involucran a más de una estructura anatómica (piel, mucosa, músculo, hueso) siendo extremadamente infrecuente el empleo de colgajos libres para defectos que de manera exclusiva afectan a la mucosa oral (Eckardt y Focas, 2003), no obstante en el siguiente apartado se expondrán brevemente los principales colgajos libres empleados en cirugía reconstructiva para reparación de defectos que involucran a la cavidad oral.

### 2.6.1 COLGAJO RADIAL

Colgajo fascial-fasciocutáneo que permite el tallado de la fascia, la piel y el tejido celular subcutáneo de la zona del antebrazo. Popularizado por Yang (Yang, 1981) a principios de los ochenta, se ha posicionado como uno de los colgajos libres más versátiles en cirugía reconstructiva, tanto intra como extraoral, de cabeza y cuello gracias a su fácil tallado, a una aceptable morbilidad en la zona donante (Figura 11), a su rica vascularización y a su adaptación a la zona receptora (Urken, 1995a). Una de sus principales indicaciones es la reconstrucción intraoral de prácticamente cualquier localización (Soutar y Scheker, 1983); (Soutar y McGregor, 1986); (Navarro y Herencia, 2004): lengua, suelo de boca (Figura 12), mucosa yugal y gingival, paladar blando y duro y paredes laterales de oro e hipofaringe. Su excelente plegabilidad y adaptabilidad, su escaso peso, la mínima atrofia que sufre a lo largo del tiempo y la capacidad sensitiva que presenta y que permite discriminar la presencia del bolo alimenticio son las principales características que hacen del colgajo radial el principal elemento reconstructivo para defectos aislados y complejos intraorales (Navarro y Herencia, 2004); (Urken, 1995a). En líneas generales es el único colgajo libre que presenta indicación en la reconstrucción de defectos que afectan de manera exclusiva a la mucosa oral.

### 2.6.2 COLGAJOS DEL SISTEMA SUBESCAPULAR

La versatilidad del sistema subescapular permite la obtención de un gran número de colgajos con variedad de tejidos basados en el sistema de la arteria axilar y principalmente de la arteria subescapular (Rowell y Davies, 1984). Los principales colgajos (Sullivan, 1995) obtenidos a partir del paquete arteriovenoso subescapular son:

- . Colgajo fasciocutáneo escapular
- . Colgajo fasciocutáneo paraescapular
- . Colgajo osteofasciocutáneo escapular-paraescapular
- . Colgajo de músculo *latissimus dorsi*
- . Colgajo musculocutáneo de *latissimus dorsi*
- . Colgajo osteomusculocutáneo de *latissimus dorsi* y costilla
- . Colgajo de músculo serrato anterior
- . Colgajo musculocutáneo de serrato anterior
- . Colgajo osteomusculocutáneo de serrato anterior y costilla

Para reconstrucción de cabeza y cuello es infrecuente la utilización combinada de estos colgajos (Sullivan, 1995). No obstante autores como Harii (Harii, et al.1982), Batchelor (Batchelor y Tully, 1984), Richards (Richards, 1987), Swartz (Swartz et al., 1986) y Aviv (Aviv y Urken, 1991) han descrito el empleo de colgajos combinados del sistema subescapular para la reconstrucción de defectos complejos tanto intra como extraorales. Las indicaciones reconstructivas de este tipo de colgajos son múltiples (Sullivan, 1995), entre ellas destacan principalmente la reconstrucción de defectos complejos de tercio medio facial, defectos orofaciales de espesor total que involucren maxilar inferior y/o superior (Urken et al., 2001), atrofia facial y ciertos casos de parálisis facial.

### 2.6.3 COLGAJO DE CRESTA ILIACA

Colgajo osteomusculocutáneo ampliamente utilizado en reconstrucciones del área maxilofacial. Este colgajo se ha consolidado como una de las mejores zonas donantes de injertos óseos corticoesponjosos no vascularizados (García Arana y González, 2004); (Kessler, 2005); (Hernández Alfaro, 2006). La identificación del paquete arteriovenosos circunflejo iliaco profundo como soporte vascular para el tallado, en un solo bloque, de pala iliaca, musculatura de la pared abdominal y piel (Taylor et al., 1979); (Sanders y Mayou, 1979) ha hecho de este colgajo libre una de los más versátiles en la reconstrucción de defectos complejos maxilomandibulares (Urken 1995b); (Lyons et al., 2005)

### 2.6.4 COLGAJO DE PERONÉ

Colgajo de tipo osteocutáneo. Empleado inicialmente para reconstrucción de defectos en huesos largos, Hidalgo (Hidalgo, 1989) emplea el colgajo de peroné para reconstruir un defecto mandibular segmentario. Una de sus principales indicaciones en Cirugía Reconstructiva de Cabeza y Cuello es la reconstrucción de defectos óseos mandibulares (Urken y Sullivan, 1995), siendo la principal alternativa al colgajo de cresta iliaca en defectos superiores a 14 cm (Navarro y Herencia, 2004).

Aunque la calidad ósea aportada por este tipo de colgajo es menor que la obtenida en colgajos de cresta iliaca, permite la rehabilitación funcional posterior mediante la colocación de implantes osteointegrados (Teoh, 2005).



Figura 4. Leucoplasia con foco de carcinoma *in situ* en borde lateral lingual. Afectación exclusiva de mucosa. Precisa extirpación con márgenes de seguridad.



Figura 5. Carcinoma epidermoide estadio IV de maxilar superior con afectación de mucosa y estructuras anexas (estructuras dentales, hueso maxilar, mucosa seno maxilar) Precisa cirugía oncológica radical y reconstrucción.



Figura 6. Granulación por segunda intención en zona de paladar blando y tuberosidad tras exanteración de adenocarcinoma de glándula salival menor.



Figura 7. Sutura directa tras resección de carcinoma epidermoide de borde lateral lingual.



Figura 8. Empleo de colgajo de músculo pectoral para reconstrucción de defecto cervical con exposición de basal mandibular.

Músculo Temporal

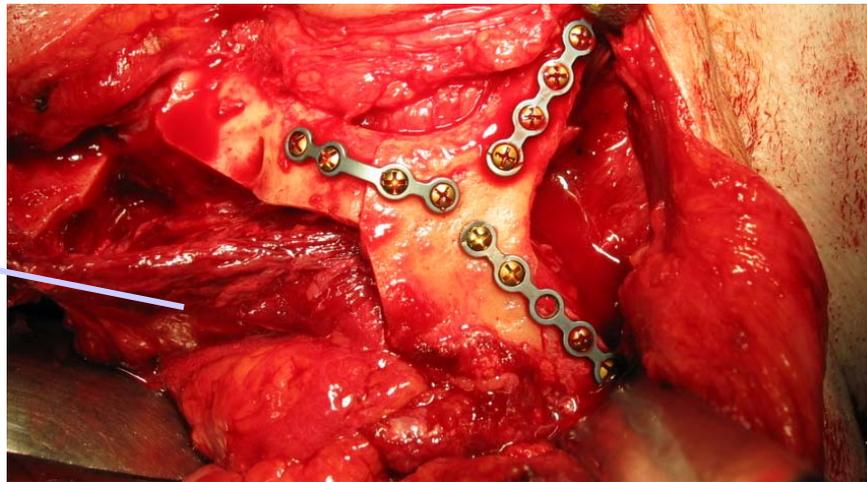
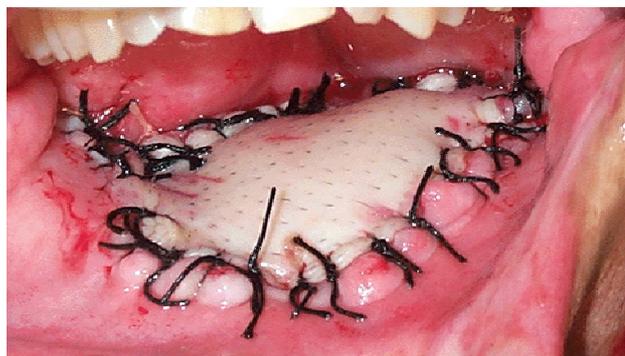


Figura 9. Empleo de colgajo de músculo temporal para reconstrucción de defecto postmaxilextomía.



Figura 10. Empleo de colgajo de paquete adiposo bucal o bola de Bichat en transición paladar blando-paladar duro y pared faríngea.



Figuras 11 y 12. Morbilidad asociada a zona donante tras tallado de colgajo fasciocutáneo radial. Empleo de colgajo radial para reconstrucción de defecto creado tras pelviglosectomía completa.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

### **Objetivo General.**

Construir mediante Ingeniería Tisular un sustituto equivalente de mucosa oral de espesor completo para su uso experimental y terapéutico.

### **Objetivos Específicos.**

1. Aislamiento y expansión de las células epiteliales –queratinocitos- y del corion –fibroblastos- de la mucosa oral a partir de biopsias.
2. Evaluación de la viabilidad de queratinocitos y fibroblastos
3. Generación de corion o lámina propia artificial.
4. Elaboración del constructo epitelio-corion.
5. Evaluación y control de calidad de la mucosa oral creada por Ingeniería Tisular.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **1.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE MUCOSA ORAL HUMANA.**

Para la realización de la presente Tesis Doctoral, se ha contado con un total de 30 muestras de mucosa oral normal de espesor total (epitelio y corion) obtenidas de 30 pacientes sanos sometidos a diferentes procedimientos de Cirugía Oral ambulatoria bajo anestesia local. Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron tratados en el Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y todos los procedimientos quirúrgicos asociados se llevaron a cabo en los quirófanos con que dicho Servicio cuenta en el Hospital. En todos los casos, se contó con el consentimiento firmado del paciente una vez que éste había sido pertinentemente informado del procedimiento (Anexo 1). En el momento de la obtención, ninguno de los pacientes seleccionados presentaba enfermedad sistémica grave, proceso neoplásico asociado o enfermedad infectocontagiosa. En ningún caso se extirpó más tejido del necesario para el tratamiento de la patología quirúrgica que presentaba el paciente.

Una vez obtenida la muestra, los tejidos extraídos fueron introducidos inmediatamente en medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich Ref. D5796, Saint- Quentin-Fallavier, Francia) suplementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomina) y antimicóticos (1,25 µg/ml de anfotericina B) (Sigma-Aldrich Ref. A5955) para evitar una eventual contaminación de la muestra. La composición del medio de cultivo DMEM se muestra a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo DMEM y HAM-F12 utilizados en este trabajo. Todos los valores están expresados en gramos por litro de medio de cultivo.

COMPONENTE	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Medio enriquecido F12(Ham)
<b>SALES INORGÁNICAS</b>		
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.265	0.0441
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	—	0.0000025
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> •9H <sub>2</sub> O	0.0001	—
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	—	0.000834
KCl	0.4	0.224
MgCl•6H <sub>2</sub> O	—	0.123
MgSO <sub>4</sub>	0.09767	—
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	0.14204
NaCl	6.4	7.599
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.109	—
NaHCO <sub>3</sub>	3.7	1.176
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	—	0.000863
<b>AMINOÁCIDOS</b>		
Glicina	0.03	0.00751
L-Alanina	—	0.009
L-Arginina•HCl	0.084	0.211
L-Asparagina•H <sub>2</sub> O	—	0.01501
L-Ácido Aspártico	—	0.0133
L-Cistina•2HCl	0.0626	0.035
L-Ácido Glutámico	—	0.0147
L-Glutamina	0.584	0.146
L-Histidina•HCl•H <sub>2</sub> O	0.042	0.02096
L-Isoleucina	0.105	0.00394
L-Leucina	0.105	0.0131
L-Lisina•HCl	0.146	0.0365
L-Metionina	0.03	0.00448
L-Fenilalanina	0.066	0.00496
L-Prolina	—	0.0345
L-Serina	0.042	0.0105
L-Treonina	0.095	0.0119
L-Triptófano	0.016	0.00204
L-Tirosina•2Na•2H <sub>2</sub> O	0.10379	0.00778
L-Valina	0.094	0.0117
<b>VITAMINAS</b>		
Colina	0.004	—
D-Pantoténico	0.004	0.00048
Ácido Fólico	0.004	0.00132
Hipoxantina	—	0.00408
Ácido Linoleico	—	0.0000084
Mio-Inositol	0.0072	0.018
Niacinamida	0.004	0.000037
Piridoxina•HCl	0.004	0.000062
Riboflavina	0.0004	0.000038
Tiamina•HCl	0.004	0.00034
Ácido Tióctico	—	0.00021
Timidina	—	0.00073
Vitamina B-12	—	0.00136
<b>OTROS</b>		
D-Glucosa	4.5	1.802
Fenol Rojo•Na	0.0159	0.0013
Ácido Pirúvico•Na	—	0.11
Putrescina•HCl	—	0.000161

## **2.- DESARROLLO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS DE MUCOSA ORAL.**

Transcurrido el periodo de transporte, todas las muestras fueron lavadas dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomina y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1,25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras. Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular del corion de la mucosa oral y conseguir la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras fueron incubadas a 37°C en una solución estéril de colagenasa tipo I de *Clostridium histolyticum* (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) al 2% en medio de cultivo DMEM durante 10-12 horas. Esta solución es capaz de digerir el colágeno del corion y liberar los fibroblastos estromales, dejando intacto el epitelio oral. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a retirar el epitelio no digerido de la mucosa oral, utilizándose éste para obtener cultivos primarios de queratinocitos.

Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contenía las células estromales disgregadas del corion, recogiendo el pellet celular correspondiente a los fibroblastos en frascos de cultivo de 15 cm<sup>2</sup> de superficie. Como medio de cultivo, se utilizó DMEM enriquecido en glucosa (Sigma-Aldrich Ref. D5796) suplementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B; Sigma-Aldrich Ref. A5955) y suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich Ref. F9665) al 10%. A este medio básico de cultivo lo denominamos MF (medio de fibroblastos).

Para la obtención de cultivos puros de queratinocitos, las muestras de epitelio no digeridas tras la incubación con colagenasa tipo I, fueron lavadas en PBS para conseguir la eliminación de los restos de enzima y posteriormente divididas en pequeños explantes mediante fragmentación mecánica en condiciones de esterilidad. Para evitar el crecimiento no deseado de fibroblastos, cuya tasa de proliferación es habitualmente muy superior a la de los queratinocitos, los explantes epiteliales se sembraron y cultivaron bajo condiciones selectivas que favorecían el crecimiento de los queratinocitos e inhibían la adhesión y la proliferación de los fibroblastos procedentes de la propia muestra, según se detalla a continuación:

A- En primer lugar, los explantes epiteliales se sembraron en frascos de cultivo de 15 cm<sup>2</sup> de superficie que contenían una capa de células alimentadoras 3T3 (ECACC 85022108) inactivadas ( $8-10 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>). La inactivación de las células 3T3 se llevo a cabo mediante irradiación (6.000 rads) o mediante tratamiento con mitomicina C de *Streptomyces caespitosus* (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. M4287, Saint Quentin-Fallavier, Francia) durante 2 horas a 37°C. Las células 3T3 (Figura 13) proceden del tejido conectivo de fetos de ratones de laboratorio y presentan una tasa de proliferación muy elevada, por lo que es necesario inactivarlas antes de iniciar el cultivo de los queratinocitos (Rheinwald y Green, 1975-1 y 1975-2). Su presencia en el cultivo, sin embargo, garantiza la disponibilidad de un gran número de factores de crecimiento y facilita la adhesión de las células epiteliales de la mucosa oral, inhibiendo la proliferación de los fibroblastos del estroma.

B- En segundo lugar, para el cultivo de queratinocitos se empleó medio de cultivo selectivo QC (De Diego et al., 2004; Llames et al., 2004), el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales sobre los fibroblastos. El medio QC estaba compuesto por 3 partes de medio DMEM rico en glucosa (Sigma-Aldrich Ref. D5796) y una parte de medio Ham F-12 (Sigma-Aldrich Ref. N6658), todo ello suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich Ref. F9665), antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B; Sigma-Aldrich Ref. A5955), 24 µg/ml de adenina (Sigma-Aldrich Ref. A9795) y distintos factores de crecimiento: 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich Ref. H0888), 5 µg /ml de insulina (Sigma-Aldrich Ref. I2767), 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF) (Becton-Dickinson Ref. 354052, Lincoln Park, Nueva Jersey, EEUU), 1,3 ng/ml de triyodotironina (Sigma-Aldrich Ref. T5516) y 8 ng/ml de toxina colérica (Sigma-Aldrich Ref. C3012).

En todos los casos, las células fueron incubadas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo fueron renovados cada tres días.

Para evaluar la integridad de la membrana basal plasmática se utilizó el ensayo de exclusión del azul tripán mediante el empleo de microscopía óptica (Rodríguez, 2005).

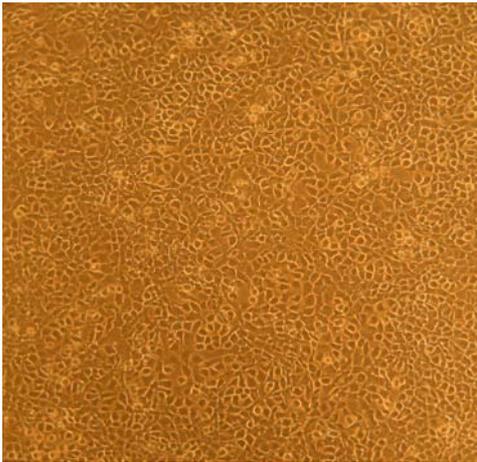


Figura 13. Cultivo subconfluente de células alimentadoras 3T3 de embrión de ratón. Estas células se utilizaron para favorecer el crecimiento selectivo de los queratinocitos orales humanos e inhibir la proliferación de los fibroblastos estromales.

### **3.- SUBCULTIVO DE LAS CÉLULAS PROCEDENTES DE CULTIVOS PRIMARIOS DE MUCOSA ORAL.**

Una vez alcanzada la confluencia celular, los distintos cultivos celulares de fibroblastos o queratinocitos se lavaron con PBS estéril y se incubaron en 1 ml de una solución de tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l (Sigma Aldrich Ref. T4799) a 37°C durante 10 minutos para disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo. Una vez que las células se desprendieron de la superficie de los frascos de cultivo, se procedió a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 1 ml de medio de cultivo MF o QC. La presencia de abundantes proteínas séricas en ambos medios de cultivo MF y QC es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina. Posteriormente, la solución inactivada en la cual se localizaban las células desprendidas, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos para obtener un pellet o botón celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El pellet celular se resuspendió cuidadosamente en 5 ml de medio MF o QC y estas células se cultivaron en frascos de cultivo de 15, 25 ó 75 cm<sup>2</sup> de superficie.

Habitualmente, los cultivos de queratinocitos se expandieron hasta aproximadamente cinco veces en nuevos frascos de cultivo con células 3T3 inactivadas. Los cultivos de fibroblastos se expandieron aproximadamente unas quince veces en frascos de cultivo carentes de células alimentadoras antes de su uso para fabricar los sustitutos de tejido conectivo.

En todos los casos, y para asegurar una adecuada viabilidad celular, la elaboración de sustitutos de mucosa oral se llevó a cabo utilizando células correspondientes a los cuatro primeros subcultivos.

#### **4.- CONGELACIÓN DE CÉLULAS.**

Una vez alcanzada la confluencia de los cultivos, se procedió a congelar las células para su conservación a largo plazo. Para ello, los fibroblastos y queratinocitos se trataron con una solución de tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l (Sigma Aldrich Ref. T4799) a 37°C durante 10 minutos para despegarlos de la superficie del frasco de cultivo. Para neutralizar la tripsina, se añadió una cantidad equivalente de medio de cultivo MF o QC (ambos contienen un 10% de SBF), obteniéndose las células separadas mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos. Tras esto, las células se mantuvieron sobre hielo y se resuspendieron en medio de congelación para queratinocitos (10% de glicerol, 15% de SBF y 75% de DMEM) o para fibroblastos (10% de DMSO, 10% de SBF y 80% de DMEM) en viales especiales para ultracongelación. Para evitar un choque térmico demasiado brusco, las células incluidas en el medio de congelación se congelaron a -20°C durante las primeras 12-24 h, pasándose a continuación a una temperatura de -60° durante 24 horas y, finalmente, a un tanque con nitrógeno líquido (inicialmente en fase vapor y después en fase líquida), donde se almacenaron a largo plazo.

Generalmente, los queratinocitos fueron congelados a una densidad 1/10. Esto significa que con un frasco de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> se prepararon 10 crioviales para congelar. Cada uno de estos crioviales servirá más adelante para sembrar un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. Para los fibroblastos, se utilizaron dos crioviales por cada frasco confluyente de 75 cm<sup>2</sup>.

#### **5.- EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MICROANÁLISIS POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X.**

Con objeto de analizar la viabilidad celular de los queratinocitos y fibroblastos mantenidos en cultivo, se utilizaron técnicas de Microanálisis por Energía Dispersiva de Rayos X (EPXMA). La metodología aplicada en la presente Tesis Doctoral tiene como base estudios previos realizados en nuestro laboratorio con la finalidad de evaluar la composición en sodio (Na), magnesio (Mg), fósforo (P), cloro (Cl), potasio (K), azufre (S) y calcio (Ca) en células en cultivo de crecimiento en monocapa y en suspensión como las células MCF-7, LLC-PK y U-937, respectivamente (Fernández-Segura et al., 1997a, 1997b; 1999).

Dicho protocolo, representado de forma esquemática en la figura 14, se llevó a cabo tal como se indica a continuación:

1) Adhesión de las células al soporte. Las células mantenidas en cultivo se tripsinizaron y se cultivaron sobre rejillas de oro (Gilder Ref. G100-G3) especiales para microscopía electrónica. En primer lugar, las rejillas se lavaron durante 5 minutos en cloroformo para eliminar cualquier resto de materia orgánica que pudiese haberse depositado sobre las mismas, aclarándose a continuación en etanol absoluto (dos lavados de 5 minutos cada uno). Finalmente, las rejillas se lavaron en ácido acético 2% durante 5 minutos y se aclararon en etanol absoluto durante otros 5 minutos, dejándose secar al aire. Para permitir el crecimiento de las células sobre las rejillas de oro, se aplicó una fina capa de Píoloformo sobre las mismas. A continuación se colocaron los cubreobjetos sobre las rejillas y se subcultivaron las células sobre éstas, incubándose posteriormente en medio de cultivo MF o QC durante 24 horas.

2) Eliminación del medio extracelular. Con el objetivo de eliminar la contribución del medio extracelular al espectro de rayos X en los análisis de los fibroblastos y los queratinocitos, se procedió al lavado de las rejillas conteniendo las células de acuerdo con los criterios establecidos previamente por diferentes autores (Abraham et al., 1985); (Borgman et al., 1994); (Fernández-Segura et al., 1997<sup>a</sup>); (von Euler et al., 1993); (Warley, 1994a); (Wroblewski et al., 1983); (Wroblewski y Roomans, 1984); (Zierold y Schäfer, 1988), eligiendo como solución lavadora el agua destilada. Las muestras fueron lavadas mediante inmersión en agua destilada a una temperatura de 4°C, durante 5 segundos. La solución lavadora se mantiene en movimiento constante por agitación magnética.

3) Criofijación de las muestras. Las muestras lavadas se criofijaron mediante inmersión rápida de las mismas en nitrógeno líquido. Previamente se eliminó el exceso de agua con un papel de filtro. Las rejillas con las células criofijadas se introdujeron en un portamuestras de aluminio preenfriado a -196°C mediante inmersión en nitrógeno líquido. El uso de este tipo de portamuestras permite el procesamiento simultáneo de varias muestras.

4) Criodesecación de las muestras. Las células criofijadas y en el interior del portamuestras fueron transferidas de forma inmediata a un sistema de criodesecación de alto vacío Emitech K775 (Emitech, Watford, UK) con el objetivo de extraer el agua de las células por sublimación (Figura 15). Las muestras fueron criodesecadas durante un total de 17 horas a una presión de vacío de 10<sup>-5</sup> mbar siguiendo el perfil de temperaturas mostrado en la Tabla 2, y desarrollado de acuerdo con los criterios establecidos por Warley y Skepper (Warley y Skepper, 2000).



Figura 15. Criodesecador de alto vacio Emitech K775 (Emitech, Watford, UK) utilizado en esta Tesis Doctoral.

Tabla 2. Programa de intervalos de tiempo y temperaturas utilizadas para la criodesecación de las muestras en un sistema de alto vacío.

Segmento	Temperatura inicial	Temperatura final	Tiempo
1	-100°C	-100°C	1 hora
2	-100°C	-70°C	1 hora
3	-70°C	-70°C	1 hora
4	-70°C	-50°C	1 hora
5	-50°C	-50°C	1 hora
6	-50°C	+25°C	12 horas

5) Montaje y recubrimiento de las muestras. Tras la criodesecación de las células, la última fase del protocolo consiste en recubrir a las muestras con una superficie conductora de electricidad, que facilite el barrido del haz de electrones durante su observación microscópica y detección analítica. Para ello, las rejillas criodesecadas y montadas sobre el portamuestras de aluminio fueron recubiertas con una capa de carbón mediante un evaporador (Emitech, Watford, UK) utilizando hilo de grafito.

6) Instrumentación, parámetros analíticos y condiciones de observación. Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral hemos utilizado un microscopio electrónico de barrido Phillips XL 30 (Phillips, Eindhoven, Holanda), equipado con una lente de objetivo cónico y un detector de energía dispersiva de rayos X con una ventana ultrafina CDU (EDAX, Eindhoven, Holanda). La configuración geométrica de este equipamiento posibilita la detección simultánea de electrones secundarios y rayos X, con una pequeña distancia de trabajo (10 mm) y un alto ángulo de toma (*take-off-angle*).

7) Observación de las muestras. Para la visualización de las muestras mediante electrones secundarios en el microscopio electrónico de barrido Phillips XL30, los parámetros fijados fueron los siguientes:

- Voltaje del microscopio..... 10 KV
- Angulación de superficie ..... 35°
- Distancia de trabajo..... 10 mm

8) Método de cuantificación para microanálisis por energía dispersiva de rayos X con microscopía electrónica de barrido. Para determinar cuantitativamente el contenido elemental de las células, se utilizó el método de la razón pico fondo -método P/B- con referencia a patrones de calibración de matriz orgánica (Boekestein et al., 1980); (Boekestein et al., 1984); (Roomans, 1988); (Statham y Pawley, 1978). La concentración de cada elemento se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C_{\text{spc}} = C_{\text{std}} \frac{\left(\frac{P}{B}\right)_{\text{spc}} \cdot \frac{Z^2}{A_{\text{spc}}}}{\left(\frac{P}{B}\right)_{\text{std}} \cdot \frac{Z^2}{A_{\text{std}}}}$$

Donde:

- $C_{\text{spc}}$  es la concentración del elemento a cuantificar,
- P corresponde a las cuentas netas de la señal característica del elemento,
- B es la radiación continua medida debajo del pico, es decir, tomada entre los mismos niveles de energía de la señal característica,
- $Z^2/A$  es el valor medio del número atómico al cuadrado por el peso atómico, correspondiente un valor específico para el dextrano y las células (Warley 1977).

9) Patrones y curvas de calibración. La preparación de los patrones se realizó de acuerdo con las pautas establecidas en nuestro laboratorio (Crespo et al., 1993); (López-Escámez y Campos, 1994) utilizando sales de  $\text{NaHPO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{K}_2\text{SO}_4$  disueltas en una matriz orgánica. Para ello, se prepararon soluciones de cada sal a diferentes concentraciones en dextrano al 20% (300 kD). Los patrones se montaron sobre membranas microporosas de las unidades Millicell® y se criofijaron mediante inmersión en nitrógeno líquido. En esta fase del proceso, así como en la posterior criodesecación, montaje y recubrimiento, se siguió el mismo procedimiento que se expuso para la preparación de células humanas para microanálisis. Los patrones se analizaron en el microscopio electrónico de barrido y se microanalizaron inmediatamente después de su preparación para evitar su contaminación o modificación química, adquiriéndose entre 15 y 20 espectros para cada concentración de patrón, utilizando las mismas condiciones de análisis que se utilizaron para las células cultivadas sobre rejillas de oro.

El análisis de los patrones de dextrano al 20% conteniendo concentraciones conocidas de sales de Na, Cl, Mg, P, S, K y Ca, nos permitió realizar la calibración de las concentraciones de los citados elementos frente a la señal P/B. La concentración de cada elemento en el estándar es directamente proporcional a la razón P/B de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$C_{\text{ts}} = K \times (P_{\text{std}}/B_{\text{std}})$$

Donde:

- $C_{\text{ts}}$  es la concentración del elemento en el patrón, la cual es conocida,

- (Pstd/Bstd) es la razón P/B, donde el fondo se ha medido entre el mismo rango de energía de la señal característica obtenida del análisis de los estándar,
- K es la constante de calibración característica para cada elemento y configuración instrumental utilizada.

La relación entre Pstd/Bstd frente a la concentración de cada elemento se estudió mediante regresión lineal simple (Figura XX). Puesto que la constante de calibración K depende de la diferencia en el  $Z^2/A$  (factor G) entre el estándar y la célula, empleamos la siguiente ecuación para valorar la influencia de dicho factor en el ajuste de la curva:

$$Y = \text{Pstd/Bstd} \cdot (Z^2/A)_{\text{std}}$$

Donde  $Z^2/A$  es el promedio del valor de  $Z^2/A$  para todos los elementos presentes en el volumen analizado de estándar:

$$Z^2/A = \sum(f_i \cdot Z_i^2 / A_i)$$

Donde:

- $Z_i$  es el número atómico del elemento  $i$ ,
- $A_i$  es el peso atómico de dicho elemento,
- $f_i$  es la fracción de masa del elemento  $i$  expresada como masa elemental/masa total (Hall y Gupta, 1982).

En la Tabla 3 se muestran las ecuaciones de regresión obtenidas para todos los elementos cuando  $Y = \text{Pstd/Bstd} \cdot Z^2/A$  se calibró frente a  $\text{Cstdt}$  para los elementos Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca analizados a 10 kV.

Tabla 3. Ecuaciones de regresión obtenidas cuando  $Y = P_{std}/B_{std} \cdot Z^2/A$  se calibró frente a Cstd analizados a 10 kV.

Elemento		
Na	$Y = 3,75 + 0,032x$	$(r = 0,99 \text{ P} < 0,001)$
Mg	$Y = 1,07 + 0,052x$	$(r = 0,98 \text{ P} < 0,001)$
P	$Y = 0,64 + 0,042x$	$(r = 0,99 \text{ P} < 0,001)$
S	$Y = 1,38 + 0,052x$	$(r = 0,97 \text{ P} < 0,001)$
Cl	$Y = 1,42 + 0,036x$	$(r = 0,99 \text{ P} < 0,001)$
K	$Y = 3,32 + 0,054x$	$(r = 0,99 \text{ P} < 0,001)$
Ca	$Y = 0,60 + 0,063x$	$(r = 0,99 \text{ P} < 0,001)$

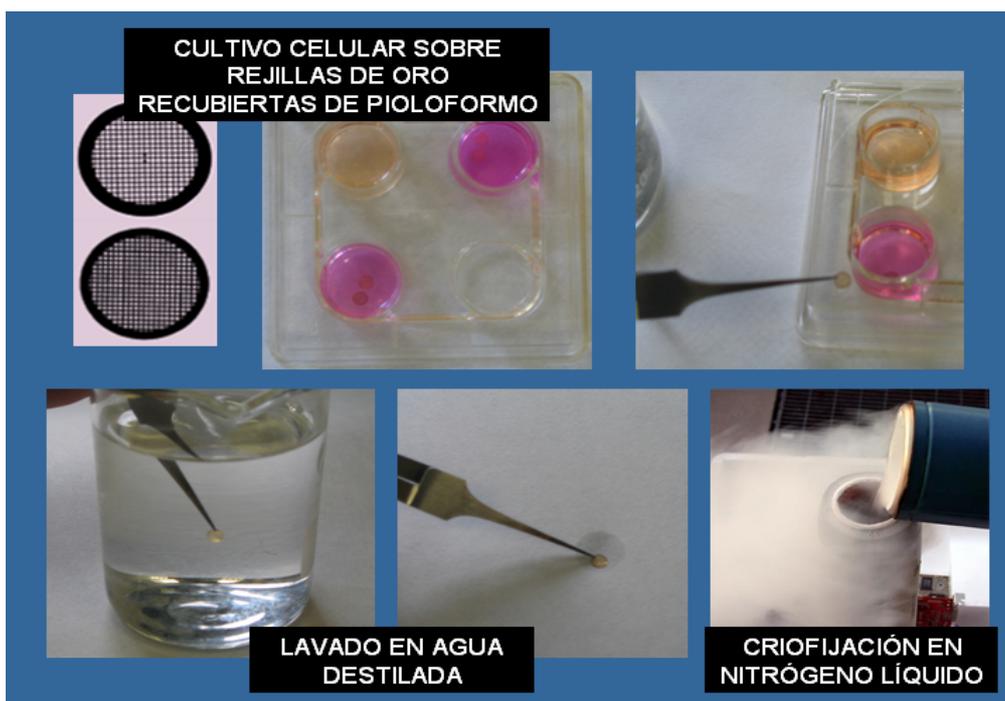


Figura 14. Preparación de células humanas mantenidas en cultivo para análisis mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X. Las células cultivadas sobre rejillas de oro cubiertas de pioloformo son lavadas en agua destilada, criofijadas por inmersión en nitrógeno líquido, desecadas en frío y recubiertas con carbón.

## 6.- DESARROLLO DE MATRICES EXTRACELULARES: ELABORACIÓN DE SUSTITUTOS DEL CORION DE LA MUCOSA ORAL.

Para la creación de matrices extracelulares de soporte o sustitutos estromales, se utilizaron cuatro modelos diferentes: geles de agarosa al 2%, geles de fibrina, geles de agarosa más fibrina y geles de colágeno tipo I, tal como se detalla a continuación.

1. Fabricación de geles de agarosa al 2%. Para la generación de sustitutos del corion de la mucosa oral, se empleó agarosa tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma-Aldrich Ref. A9045) disuelta en PBS. En primer lugar, se disolvió la agarosa sólida al 2% (p/v) en PBS, calentando la mezcla hasta ebullición para favorecer la disolución de la agarosa. Esta solución de agarosa al 2% en PBS se esterilizó a 120°C y 2 atmósferas de presión mediante autoclavado. Para la fabricación de sustitutos estromales, se incubaron al baño maria unos 20 ml del gel de agarosa hasta alcanzar el punto de fusión, momento en el que se añadieron 500.000 fibroblastos de mucosa oral obtenidos mediante tripsinización del cultivo primario de fibroblastos. Para llevar a cabo esta acción, se tuvo especial cuidado en utilizar la disolución de agarosa a temperaturas muy bajas, cercanas al punto de gelificación, evitando así el daño térmico a los fibroblastos de la mezcla. Una vez mezcladas las células y la disolución de agarosa, la mezcla aún líquida se alicuotó en recipientes estériles de cultivo celular y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 5 minutos (Figura 16).

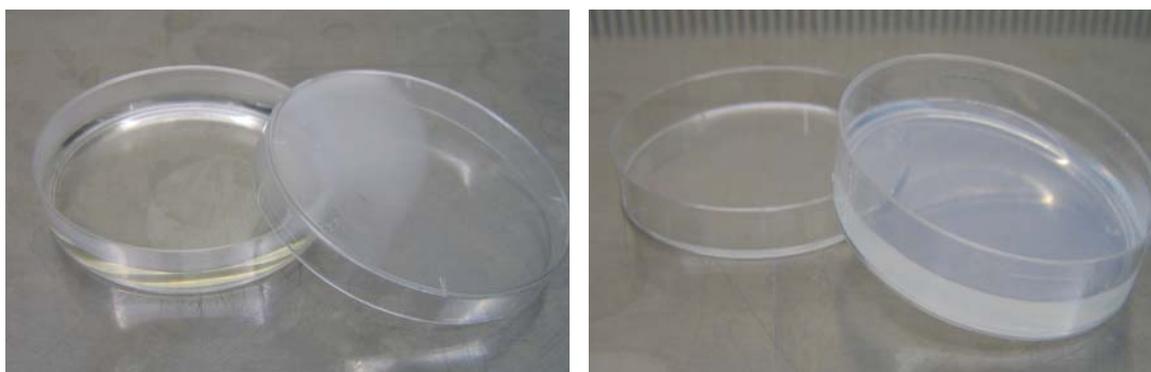


Figura 16. Gel de agarosa al 2% sobre una placa de Petri estéril para cultivo celular. En la imagen de la izquierda se aprecia el gel en estado líquido, mientras que a la derecha se aprecia el mismo gel después de solidificar.

2. Fabricación de geles de fibrina humana. Para la generación de geles de fibrina humana, se utilizó plasma sanguíneo humano congelado procedente de donantes sanos (cedido por el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería, España) siguiendo las normas y recomendaciones de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (American Association of Blood Banks, 1990). La fabricación de sustitutos estromales de fibrina con fibroblastos se llevó a cabo utilizando una modificación de la técnica previamente descrita por Meana y colaboradores (Meana et al., 1998); (Llames et al., 2004). Para ello, se utilizaron 50.000 fibroblastos procedentes de los cultivos primarios, resuspendidos en 2 ml de medio de cultivo DMEM, a los cuales se añadieron unos 5 ml de plasma sanguíneo humano (equivalente a 10-12 mg de fibrinógeno) y 14 ml de suero salino al 0,9%. Para evitar la fibrinólisis espontánea de los geles de fibrina, se añadieron 200  $\mu$ l de ácido tranexámico (Amchafibrín®, Fides Ecofarma, Valencia, España). Finalmente, la reacción de coagulación de la fibrina se precipitó mediante la adición de 1 ml de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0,025mM a la mezcla, alicuotándose ésta inmediatamente en pocillos, placas de Petri o frascos de cultivo (Figura 17). Los geles alicuotados se dejaron en el incubador a 37°C con un 5% de  $\text{CO}_2$ , durante 2 horas para que coagularan y secaran. Después de este tiempo se cubrieron con 10 ml de medio de cultivo QC.

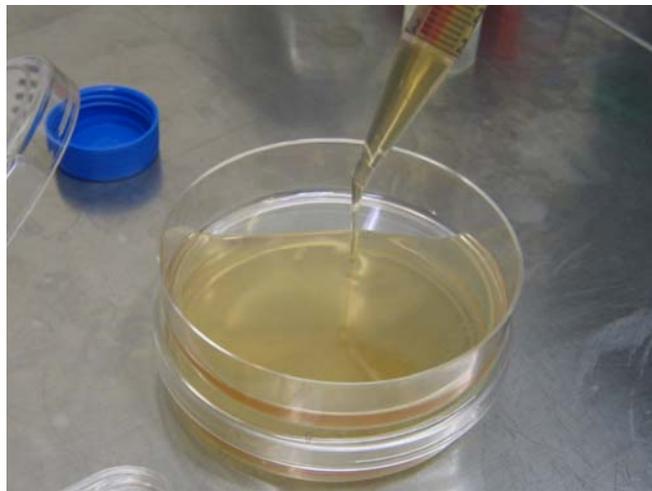


Figura 17. Preparación de sustitutos estromales de fibrina humana. La mezcla que contenía el plasma, los fibroblastos, el agente antifibrinolítico, el suero salino y el cloruro cálcico se alicuotó en placas de Petri antes de que comenzara la reacción de coagulación del plasma.

3. Fabricación de geles de agarosa más fibrina. Para la elaboración de geles de agarosa y fibrina, se obtuvo una mezcla de fibrina, suero salino, ácido tranexámico y fibroblastos tal como se describió en el apartado anterior. Sin embargo, justo después de precipitar la reacción de coagulación con cloruro cálcico, se añadió una pequeña cantidad de agarosa tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma-Aldrich Ref. A9045) disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión. La concentración final de agarosa en el gel fue del 0,1% (p/v). Una vez mezclados todos los componentes, y evitando un trauma físico excesivo, estos geles se alicuotaron cuidadosamente en diferentes superficies de cultivo.

4. Fabricación de geles de colágeno. Los geles de colágeno se prepararon utilizando colágeno tipo I de cola de rata disponible comercialmente (Roche Diagnostics Ref. 11179179001, Basilea, Suiza) y siguiendo la metodología previamente establecida por otros autores (Lee y Cho, 2005); (Navarro et al., 2001) y por la propia casa comercial. En primer lugar, el colágeno liofilizado se redisolvió en 3 ml de una solución estéril de ácido acético al 0,2% durante 12 h sin agitación. Posteriormente, para la generación de sustitutos del corion de la mucosa oral, se añadieron 50.000 fibroblastos tripsinizados del cultivo primario y resuspendidos en 200 µl de medio de cultivo MF. Para inducir la gelificación de la solución de colágeno tipo I con fibroblastos, se añadió a la mezcla 300 µl de una solución de bicarbonato sódico estéril (25 mg/ml), alicuotándose la mezcla rápida pero cuidadosamente en los pocillos destinados a la generación de los constructos de mucosa oral. De este modo, mediante aumento del pH, las fibras de colágeno disueltas en ácido comenzaron a formar un gel semisólido que se dejó secar durante 2 h en incubador a 37°C.

## **7.- CONSTRUCCIÓN DE SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.**

La construcción de sustitutos de mucosa oral ortotípica de espesor completo, se llevó a cabo de modo secuencial. Para ello, en primer lugar se elaboró un sustituto de estroma de mucosa oral y, en un segundo tiempo, se fabricó un equivalente epitelial en la superficie del mismo. Además, para garantizar una correcta diferenciación y estratificación del epitelio construido, se utilizó la técnica de cultivo denominada interfase aire-líquido (Reichl y Müller-Goymann, 2003). Para ello, los constructos de mucosa oral se elaboraron en sistemas de cultivo Transwell® con membranas porosas de 0,4 µm (Costar, Corning Inc., Corning, Nueva York, EEUU). Estos sistemas de cultivo están compuestos por una placa estéril de 6 pocillos en el interior de los cuales

se aloja una pieza de plástico móvil cuya base está formada por una membrana porosa y permeable de nylon o policarbonato (Figura 18). El tamaño de estos poros permite a los nutrientes pasar a través de la membrana de la placa pero evita la migración de las células de un compartimento a otro. La construcción de los sustitutos de mucosa oral se llevó a cabo, en primer lugar, empleando uno de los sustitutos estromales descritos en el apartado anterior (agarosa, fibrina, fibrina más agarosa o colágeno con fibroblastos), elaborado directamente sobre la membrana porosa del sistema de cultivo Transwell®. En segundo lugar, 24 h más tarde, se tripsinizaron los cultivos primarios de queratinocitos, cultivándose las células epiteliales individualizadas sobre las superficie de los sustitutos estromales en medio QC. Finalmente, 15 días después de establecer el cultivo epitelial, se utilizó la técnica aire-líquido, para lo cual se añadió medio de cultivo QC al depósito inferior del sistema, pero no al superior, que se expuso directamente al aire. Esta técnica aire-líquido se mantuvo durante 15 días más.

Todo el proceso descrito se muestra de forma esquemática en la Figura 19.



Figura 18. Sistemas de cultivo Transwell® con membranas porosas de 0,4  $\mu\text{m}$  (Costar, Corning Inc., Corning, Nueva York, EEUU).

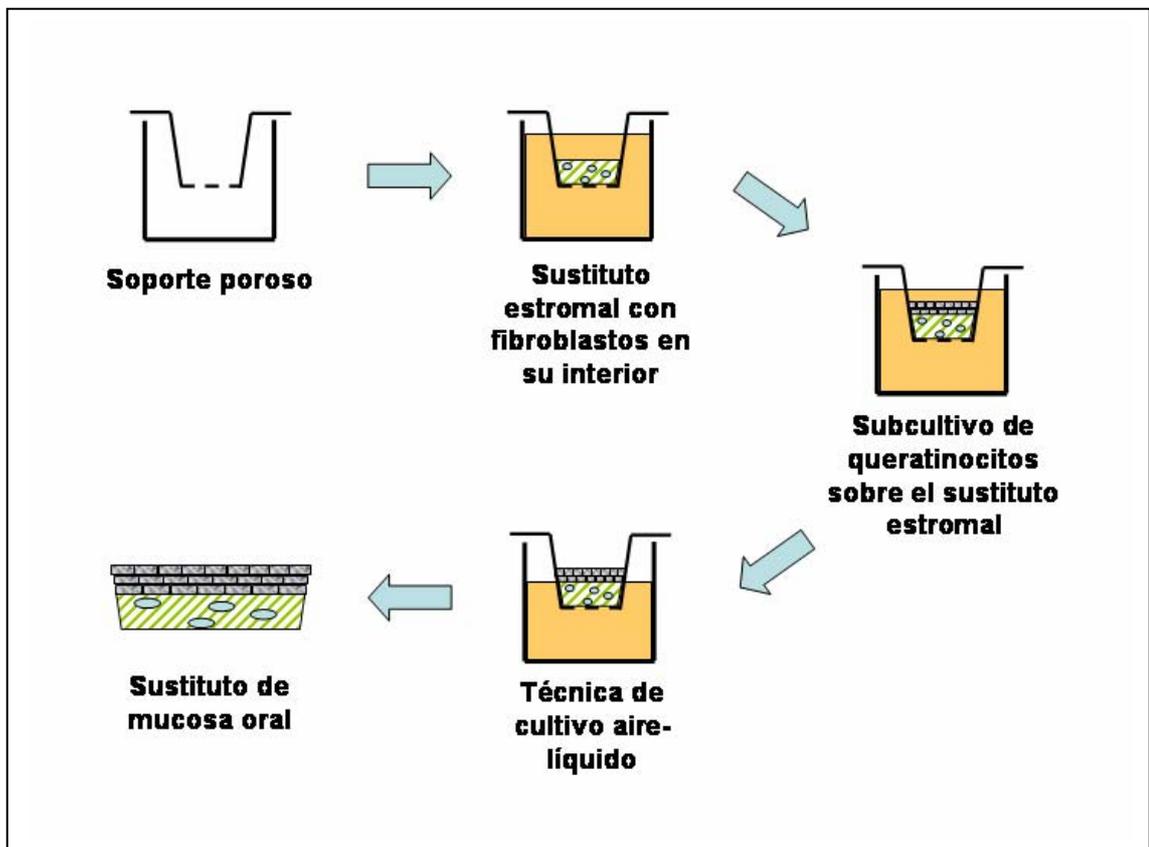


Figura 19. Elaboración de sustitutos de mucosa oral utilizando una técnica secuencial sobre sistemas de cultivo Transwell®.

## 8.- EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL

Para el análisis de los tejidos mediante microscopía óptica, las muestras control y los constructos artificiales de mucosa oral se fijaron en formaldehído al 4% tamponado y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 96 y 100%). A continuación, el etanol se sustituyó por xileno para permitir la inclusión de las muestras en parafina. Una vez enfriados los bloques de parafina, se obtuvieron secciones transversales de 4  $\mu\text{m}$  de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina para su examen histológico mediante el microscopio óptico.

Para el estudio de los tejidos mediante microscopía electrónica de barrido, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 3% en 0,1 M tampón fosfato (pH 7,2) a 4°C

durante 4-6 horas, lavándose a continuación dos veces en 0,1 M tampón fosfato (pH 7,2) a 4°C. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (30, 50, 70, 95 y 100%), desecándose por completo mediante el método del punto crítico (Fernández-Segura, 1999). Este método consiste en la sustitución de la acetona tisular, junto con cualquier resto de agua que pudiese quedar en las muestras, por CO<sub>2</sub> líquido en frío. A continuación, el CO<sub>2</sub> es evaporado a baja presión, aumentándose progresivamente la temperatura, hasta que la muestra queda desecada por completo. Una vez desecados, los tejidos fueron recubiertos por átomos de oro y analizados en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 utilizando el modo de alto vacío.

Para el análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión, las muestras se fijaron, lavaron y deshidrataron como se describió para microscopía electrónica de barrido. Posteriormente, las muestras se incluyeron en resina de Spurr durante 24 h a 4°C, utilizando como agente intermedio el óxido de propileno. Tras este periodo de tiempo, se procedió a su polimerización durante 2 h a 60°C. Finalmente, se realizaron cortes ultrafinos de 100 nm de espesor de las muestras incluidas en resina, utilizando para ello un ultramicrotomo Reichert Ultracut. El montaje de las secciones ultrafinas se realizó sobre rejillas de cobre de malla 300 y teñidas con acetato de uranilo al 2% en agua destilada durante 10 min y citrato de plomo durante 5 minutos de acuerdo con la metodología descrita por Reynolds (Reynolds, 1963).

La observación se llevo a cabo con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM902 (Oberkochem, Alemania)

## **RESULTADOS**

## **1. GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS DE MUCOSA ORAL.**

El tratamiento enzimático de las muestras de mucosa oral humana demostró ser efectivo en las muestras de biopsias que se procesaron, obteniéndose abundantes células en todos los casos. Morfológicamente, estas células se observaron al microscopio óptico como elementos esféricos de pequeño tamaño (alrededor de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro) que permanecían en suspensión en el medio de cultivo durante las primeras horas posteriores a su aislamiento. Todos los tejidos fueron completamente disgregados tras el tratamiento con tripsina y colagenasa, no obteniéndose ningún tipo de resto tisular microscópicamente visible. El tratamiento de las células obtenidas con azul tripán demostró que el 91% de las mismas conservaba su viabilidad, aunque el estrés mecánico y químico al que habían sido sometidas las células, había provocado la muerte del 9% de las mismas.

### Generación de cultivos primarios de fibroblastos.

El cultivo primario de fibroblastos se llevó a cabo en ausencia de células de soporte ó células 3T3, y a diferencia de los queratinocitos mostraron un crecimiento celular muy rápido a partir de los primeros días. A las 24 h ( $\pm 6$ ), la mayor parte de las células se encontraban adheridas al fondo del frasco de cultivo y comenzaron a emitir pequeñas prolongaciones a modo de pseudópodos, el crecimiento de los fibroblastos se evidenció entre las 48 y 72 horas de cultivo, configurándose en el 5º día, una trama celular, formada por células con largas prolongaciones, que acaba, a partir del 7º día, por convertirse en una masa de células fusiforme que ocupaban toda la superficie del cultivo -cultivos confluentes- (Figura 20).

### Generación de cultivos primarios de queratinocitos.

Siguiendo la metodología previamente descrita, los queratinocitos se cultivaron en presencia de células 3T3 inactivadas con mitomicina C. El crecimiento de los queratinocitos resultó ser más lento que el de los fibroblastos, de manera que la expansión de las mismas se estableció de forma evidente a partir de séptimo día (media 8,2 desviación típica 3,1), observándose pequeñas colonias o islas constituidas por 4 ó 5 células redondeadas, de mayor tamaño que las células 3T3 y con un citoplasma muy poco refringente. Estas colonias, esparcidas a lo largo de todo el cultivo (media 8 colonias por frasco de 25  $\text{cm}^2$  de área, desviación típica 5,5), presentaron un diámetro medio de 1 mm y fueron aumentando progresivamente de tamaño hasta hacerse confluentes, llegando a ocupar toda la superficie del frasco de cultivo después de 28 días (desviación típica 13,1), desplazando por completo a las células 3T3, cuyo crecimiento está inhibido por el tratamiento con mitomicina C (Figura 21). En este momento, el análisis, mediante microscopía óptica, pone de relieve la

existencia de una población celular continua de queratinocitos, configurando una monocapa celular en la superficie de los frascos de cultivo, constituida por células irregularmente poliédricas con un núcleo voluminoso en el que se pueden apreciar hasta tres nucleolos y un citoplasma rico en retículo endoplásmico de consistencia hialina.

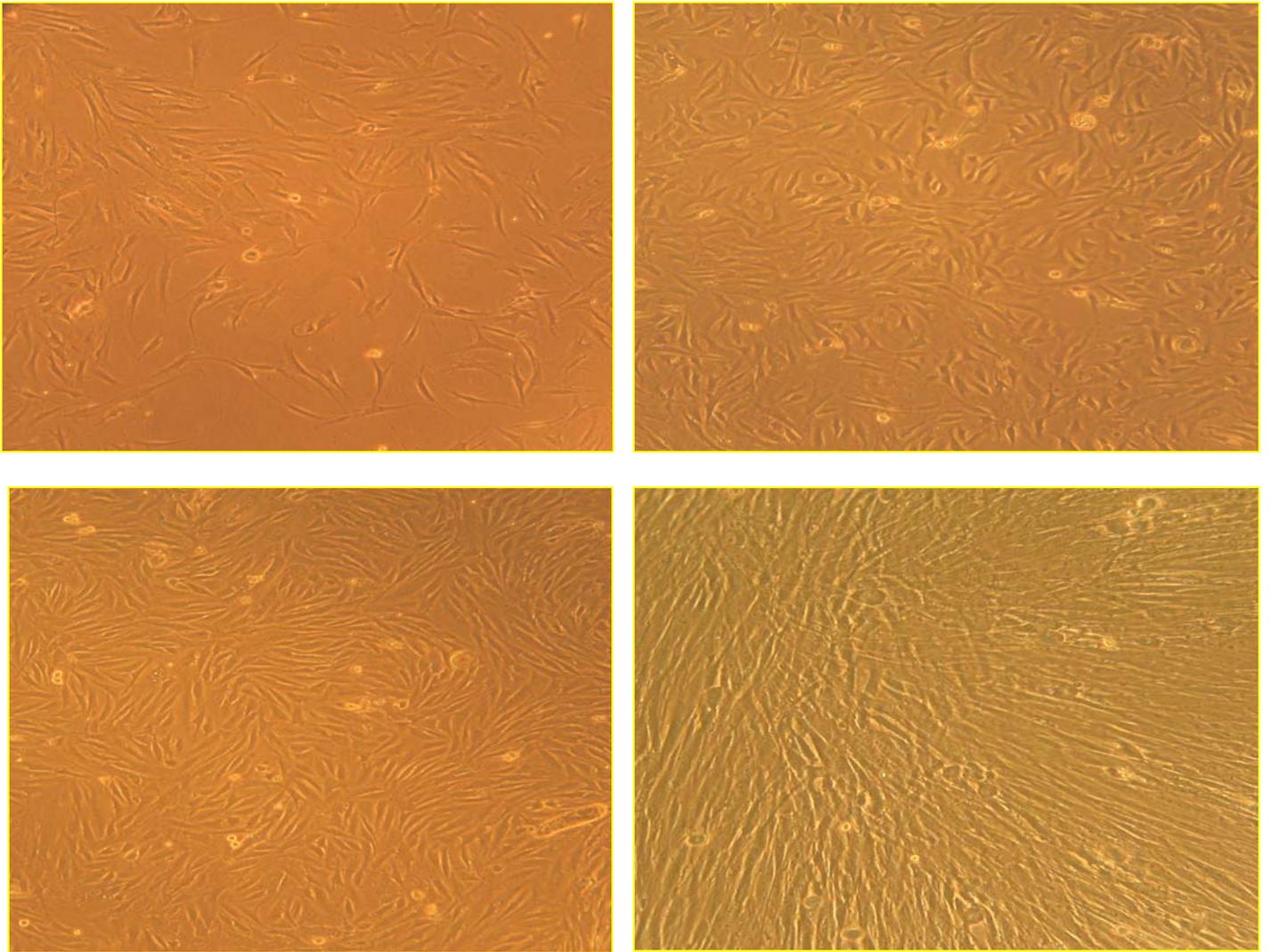


Figura 20. Cultivos de fibroblastos (M.O.). Evolución de la confluencia durante la primera semana.

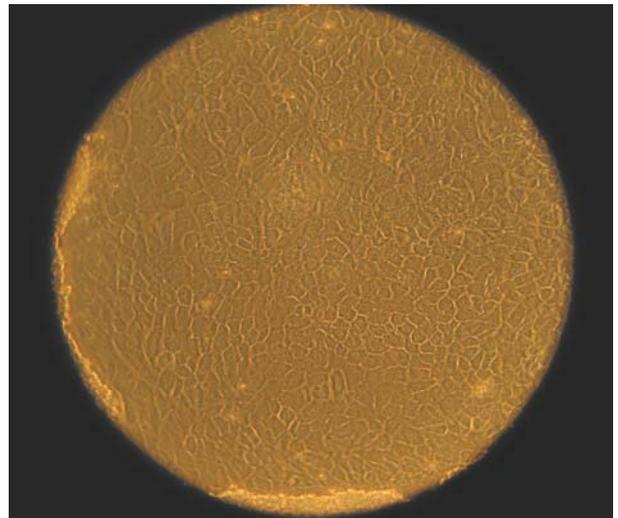
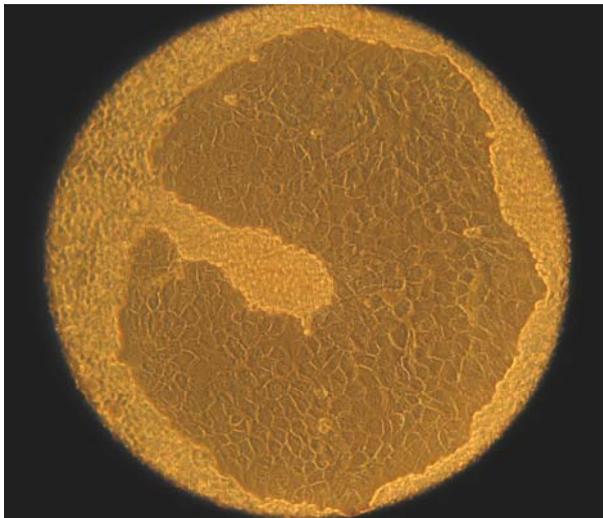
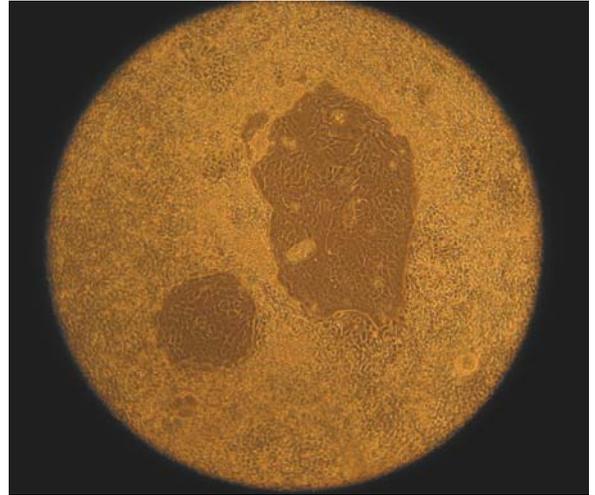
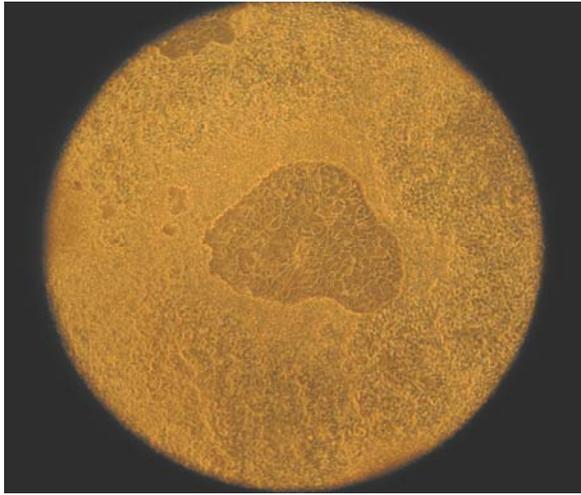


Figura 21. Cultivos de queratinocitos (M.O.). Evolución de la confluencia y desplazamiento de las células 3T3. Semanas 1,2, 3 y 4 respectivamente.

## 2. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MICROANÁLISIS POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X.

En el siguiente apartado expondremos los resultados cuantitativos y cualitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en los fibroblastos y queratinocitos analizados.

Al realizar el análisis microanalítico, se eligieron células situadas en el centro de cada cuadrante, desechando aquellas células ubicadas en el metal de la rejilla, con lo que evitamos la aparición de espectros anómalos generados por el elemento Au.

En el gráfico representado más abajo (Figura 22) se aprecia el espectro iónico ortotípico –cualitativo- de un fibroblasto.

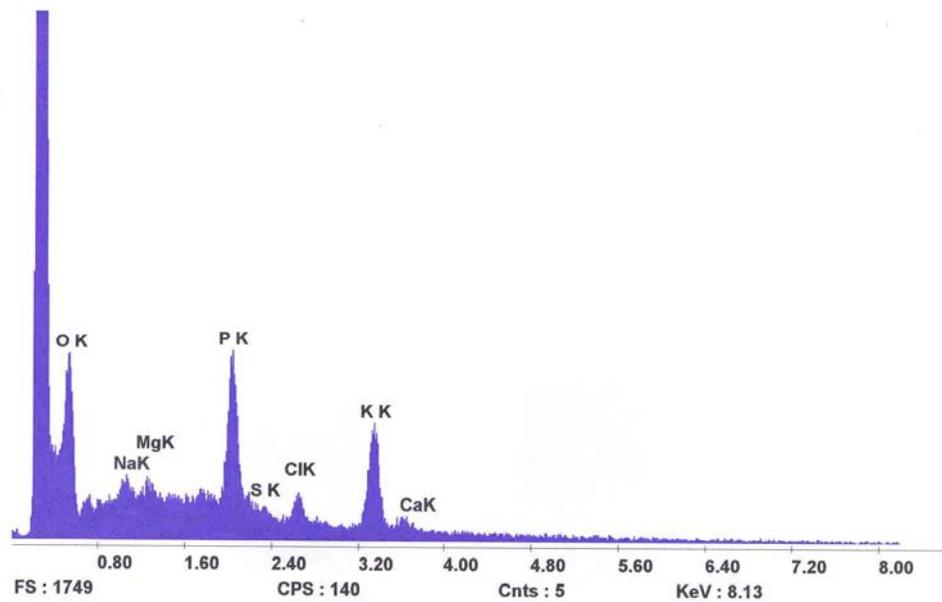


Figura 22. Perfil iónico –cualitativo- de uno de los fibroblastos analizados (Fibroblasto 14).

En las tablas 4 a 15, expuestas a continuación, se presentan los resultados cualitativos del microanálisis de cada una de las células analizadas (30 fibroblastos y 30 queratinocitos). En ellas se describe el orbital atómico K de cada ión analizado (Na, Mg, P, S, Cl, K y Ca) [elemento], el número total de cuentas por segundo que emite al ser bombardeado con el haz electrónico [CPS], el background o radiación de fondo y la relación de estos dos productos pico/fondo [P/B]. La última columna de cada tabla corresponde a los resultado cuantitativos expresados en milimoles por kilogramo de peso en seco [Mm/Kg (seco)]

Asimismo se representan mediante tablas las medias (M) y desviaciones estandar (DE) de cada elemento cuantificado en el total de fibroblastos y queratinocitos (Tablas 16 y 17).

Una vez obtenidos el total de resultados, el índice K/Na en fibroblastos es 8,45 y el índice K/Na en fibroblastos es 10,44.

Tabla 4. Resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en fibroblastos [Fibroblastos 1 a 5].

Nº Fibroblasto	Elemento	CPS	Background	P/B	mmol/kg
1	Na K	1,39	1,75	0,79	66,97
	Mg K	1,08	1,72	0,63	33,32
	P K	8,27	1,32	6,29	435,24
	S K	2,12	1,18	1,80	98,01
	Cl K	2,45	1,02	2,40	191,50
	K K	6,76	0,78	8,66	444,01
	Ca K	0,26	0,68	0,39	19,01
2	Na K	2,96	2,76	1,07	90,70
	Mg K	2,78	2,80	0,99	52,35
	P K	17,64	2,45	7,20	498,20
	S K	3,35	2,36	1,42	77,32
	Cl K	3,76	2,21	1,70	135,65
	K K	11,99	1,97	6,10	312,75
	Ca K	0,00	1,75	0,00	0
3	Na K	2,86	4,68	0,61	51,71
	Mg K	1,47	4,72	0,31	16,39
	P K	18,53	4,11	4,51	312,07
	S K	3,72	3,12	1,19	64,80
	Cl K	5,01	2,32	2,16	172,35
	K K	14,72	1,91	7,68	393,76
	Ca K	0,43	1,57	0,27	13,15
4	Na K	1,99	3,85	0,52	44,08
	Mg K	1,22	3,66	0,33	17,45
	P K	13,18	3,03	4,35	300,99
	S K	2,79	2,30	1,21	65,88
	Cl K	3,73	1,74	2,15	171,55
	K K	11,97	1,44	8,31	426,06
	Ca K	0,00	1,44	0,00	0
5	Na K	3,10	6,20	0,50	42,39
	Mg K	1,78	6,29	0,28	14,81
	P K	22,59	5,06	4,47	309,30
	S K	5,32	3,82	1,39	75,69
	Cl K	6,16	2,94	2,10	167,57
	K K	16,34	2,14	7,62	390,69
	Ca K	0,23	2,04	0,11	5,36

Tabla 5. Resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en fibroblastos [Fibroblastos 6 a 10].

Nº Fibroblasto	Elemento	CPS	Background	P/B	mmol/kg
6	Na K	1,11	3,67	0,30	25,43
	Mg K	1,09	3,46	0,31	16,39
	P K	12,88	3,34	3,86	267,09
	S K	3,34	2,41	1,38	75,14
	Cl K	4,12	1,63	2,52	201,08
	K K	11,02	1,40	7,87	403,50
	Ca K	0,27	1,16	0,23	11,21
7	Na K	1,37	4,82	0,28	23,74
	Mg K	1,18	4,91	0,24	12,69
	P K	19,07	4,30	4,43	306,53
	S K	2,80	3,45	0,81	44,10
	Cl K	4,95	2,42	2,04	162,78
	K K	15,05	1,87	8,07	413,76
	Ca K	0,36	1,47	0,24	11,70
8	Na K	1,90	4,26	0,45	38,15
	Mg K	1,52	3,93	0,39	20,62
	P K	17,00	3,78	4,50	311,38
	S K	3,53	2,80	1,26	68,61
	Cl K	4,69	1,93	2,43	193,90
	K K	13,80	1,57	8,79	450,67
	Ca K	0,41	1,36	0,31	15,11
9	Na K	2,39	5,13	0,47	39,84
	Mg K	2,01	5,03	0,40	21,15
	P K	18,68	4,16	4,48	309,99
	S K	3,66	2,98	1,23	66,97
	Cl K	5,43	2,08	2,61	208,26
	K K	13,93	1,92	7,25	371,71
	Ca K	0,27	1,92	0,14	6,82
10	Na K	2,26	4,68	0,48	40,69
	Mg K	1,49	4,95	0,30	15,86
	P K	14,98	3,69	4,06	280,93
	S K	3,52	2,91	1,21	65,88
	Cl K	4,58	2,18	2,10	167,57
	K K	12,57	1,93	6,50	333,26
	Ca K	0,54	1,54	0,35	17,06

Tabla 6. Resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en fibroblastos [Fibroblastos 11 a 15].

Nº Fibroblasto	Elemento	CPS	Background	P/B	mmol/kg
11	Na K	2,27	2,54	0,89	75,45
	Mg K	1,66	2,97	0,56	29,61
	P K	10,19	2,97	3,43	237,34
	S K	2,70	2,14	1,26	68,61
	Cl K	3,73	1,54	2,41	192,30
	K K	9,60	1,20	8,00	410,17
	Ca K	0,49	1,20	0,40	19,49
12	Na K	2,97	5,34	0,56	47,47
	Mg K	2,28	5,42	0,42	22,21
	P K	21,44	4,70	4,57	343,90
	S K	3,81	3,44	1,11	60,44
	Cl K	5,95	2,52	2,36	188,31
	K K	16,13	2,06	7,85	402,48
	Ca K	0,57	1,89	0,30	14,62
13	Na K	1,71	3,42	0,50	42,39
	Mg K	1,45	3,02	0,48	25,38
	P K	11,61	2,80	4,15	287,16
	S K	2,22	2,08	1,07	58,26
	Cl K	4,49	1,44	3,11	248,16
	K K	11,19	1,17	9,56	490,15
	Ca K	0,41	0,88	0,47	22,90
14	Na K	3,06	5,59	0,55	46,62
	Mg K	1,73	6,04	0,29	15,34
	P K	20,28	4,59	4,42	305,84
	S K	3,76	3,59	1,05	57,17
	Cl K	6,84	2,79	2,45	195,49
	K K	18,02	2,16	8,34	427,60
	Ca K	0,53	2,06	0,26	12,67
15	Na K	1,36	3,60	0,38	32,21
	Mg K	1,39	3,60	0,39	20,62
	P K	12,82	2,97	4,32	298,92
	S K	2,93	2,18	1,34	72,96
	Cl K	3,87	1,71	2,27	181,13
	K K	11,23	1,26	8,91	459,82
	Ca K	0,31	1,32	0,23	11,21

Tabla 7. Resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en fibroblastos [Fibroblastos 16 a 20].

Nº Fibroblasto	Elemento	CPS	Background	P/B	mmol/kg
16	Na K	3,99	4,84	0,82	69,51
	Mg K	1,81	5,18	0,35	18,51
	P K	17,03	3,97	4,29	296,85
	S K	5,07	3,13	1,62	88,21
	Cl K	4,45	2,49	1,79	142,83
	K K	11,19	1,95	5,74	294,30
	Ca K	0,95	1,56	0,61	29,73
17	Na K	1,21	3,07	0,39	33,06
	Mg K	0,93	2,73	0,34	17,98
	P K	10,01	1,96	5,12	354,28
	S K	1,96	1,51	1,29	70,24
	Cl K	2,65	1,21	2,19	174,75
	K K	7,55	1,02	7,40	379,41
	Ca K	0,23	0,96	0,24	11,70
18	Na K	2,07	3,05	0,68	57,64
	Mg K	0,92	3,28	0,28	14,81
	P K	12,28	2,85	4,31	298,23
	S K	2,09	2,11	0,99	53,91
	Cl K	3,38	1,41	2,39	190,71
	K K	10,00	1,25	8,04	412,22
	Ca K	0,00	1,37	0,00	0
19	Na K	2,23	5,05	0,44	37,30
	Mg K	1,64	4,64	0,35	18,51
	P K	16,25	3,92	4,14	286,47
	S K	4,01	2,94	1,36	74,05
	Cl K	4,80	2,20	2,18	173,95
	K K	13,74	1,80	7,61	390,17
	Ca K	0,78	1,36	0,58	28,26
20	Na K	1,96	5,58	0,35	29,67
	Mg K	1,12	5,58	0,20	10,58
	P K	17,69	4,00	4,42	305,84
	S K	5,41	3,09	1,75	95,29
	Cl K	5,11	2,36	2,17	173,15
	K K	11,95	1,80	6,64	340,44
	Ca K	0,00	1,80	0,00	0

Tabla 8. Resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en fibroblastos [Fibroblastos 21 a 25].

Nº Fibroblasto	Elemento	CPS	Background	P/B	mmol/kg
21	Na K	4,32	6,07	0,71	60,19
	Mg K	3,24	6,45	0,50	26,44
	P K	23,84	5,55	4,30	297,54
	S K	4,39	4,36	1,01	54,99
	Cl K	6,45	3,24	1,99	158,79
	K K	17,47	2,25	7,76	397,86
	Ca K	0,73	2,09	0,35	17,06
22	Na K	2,02	3,33	0,61	51,71
	Mg K	1,08	3,38	0,32	16,92
	P K	14,66	3,24	4,52	312,76
	S K	3,34	2,38	1,40	76,23
	Cl K	3,87	1,70	2,28	181,93
	K K	11,88	1,20	9,90	507,58
	Ca K	0,43	1,20	0,36	17,54
23	Na K	2,10	2,87	0,73	61,88
	Mg K	1,49	2,99	0,50	26,44
	P K	13,15	2,80	4,70	325,22
	S K	2,77	2,19	1,26	68,61
	Cl K	2,95	1,72	1,72	137,24
	K K	10,03	1,26	7,93	406,58
	Ca K	0,47	1,08	0,43	20,95
24	Na K	2,09	3,87	0,54	45,78
	Mg K	1,10	3,81	0,29	15,34
	P K	12,32	3,20	3,85	266,40
	S K	3,91	2,36	1,66	90,39
	Cl K	4,63	1,76	2,63	209,86
	K K	10,52	1,50	7,04	360,95
	Ca K	0,60	1,36	0,44	21,44
25	Na K	2,51	6,86	0,37	31,37
	Mg K	1,97	6,93	0,28	14,81
	P K	24,43	5,78	4,23	292,69
	S K	5,98	4,38	1,37	74,60
	Cl K	6,56	3,39	1,93	153,20
	K K	19,28	2,38	8,12	416,32
	Ca K	0,89	2,19	0,41	19,98

Tabla 9. Resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en fibroblastos [Fibroblastos 26 a 30].

Nº Fibroblasto	Elemento	CPS	Background	P/B	mmol/kg
26	Na K	2,43	6,28	0,39	33,06
	Mg K	2,15	6,36	0,34	17,98
	P K	22,76	5,19	4,39	303,77
	S K	5,97	4,12	1,45	78,95
	Cl K	7,11	3,20	2,22	177,14
	K K	18,66	2,45	7,60	389,66
	Ca K	0,70	2,27	0,31	15,11
27	Na K	2,90	5,50	0,53	44,93
	Mg K	1,54	5,86	0,26	13,75
	P K	20,12	5,43	3,71	256,71
	S K	4,19	3,95	1,06	57,72
	Cl K	6,30	2,72	2,32	185,12
	K K	16,00	2,19	7,31	374,79
	Ca K	0,41	2,00	0,20	9,75
28	Na K	3,21	5,28	0,61	51,71
	Mg K	2,54	5,82	0,44	23,27
	P K	19,65	4,60	4,27	295,46
	S K	5,11	3,47	1,47	80,04
	Cl K	5,99	2,58	2,32	185,12
	K K	16,78	1,97	8,52	436,83
	Ca K	0,40	2,06	0,19	9,26
29	Na K	3,15	5,07	0,62	52,56
	Mg K	1,89	5,34	0,35	18,51
	P K	20,55	4,72	4,36	301,69
	S K	4,58	3,67	1,27	69,15
	Cl K	5,80	2,74	2,11	168,36
	K K	16,05	2,16	7,43	380,94
	Ca K	0,27	2,10	0,13	6,34
30	Na K	2,12	3,98	0,53	44,93
	Mg K	1,54	4,10	0,38	20,09
	P K	12,58	3,40	3,70	256,02
	S K	4,00	2,75	1,45	78,95
	Cl K	4,74	2,01	2,36	188,31
	K K	11,40	1,77	6,44	330,19
	Ca K	0,82	1,90	0,43	20,95

Tabla 10. Resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en queratinocitos [Queratinocitos 1 a 5].

Nº Queratinocito	Elemento	CPS	Background	P/B	mmol/kg
1	Na K	2,51	4,23	0,59	50,01
	Mg K	1,62	4,30	0,38	20,09
	P K	13,28	3,48	3,81	263,63
	S K	1,15	2,57	0,45	24,50
	Cl K	4,57	1,77	2,58	205,87
	K K	9,78	1,38	7,12	365,05
	Ca K	0,57	1,04	0,55	26,80
2	Na K	1,27	2,63	0,48	40,69
	Mg K	1,36	3,29	0,41	21,68
	P K	7,36	2,65	2,78	192,36
	S K	1,99	2,30	0,87	47,37
	Cl K	3,09	1,85	1,67	133,25
	K K	7,10	1,46	4,86	249,18
	Ca K	0,25	1,32	0,19	9,26
3	Na K	1,59	4,87	0,33	27,97
	Mg K	1,74	5,25	0,33	17,45
	P K	11,26	3,72	3,02	208,97
	S K	2,18	3,07	0,71	38,66
	Cl K	5,05	2,43	2,08	165,97
	K K	11,53	1,60	7,23	370,69
	Ca K	0,65	1,34	0,49	23,88
4	Na K	0,58	4,01	0,15	12,72
	Mg K	1,47	4,01	1,37	19,57
	P K	10,52	3,10	3,40	235,26
	S K	2,11	2,43	0,87	47,37
	Cl K	5,80	1,94	2,99	238,58
	K K	10,78	1,54	7,00	359,90
	Ca K	0,62	1,16	0,53	25,83
5	Na K	1,25	3,69	0,34	28,82
	Mg K	1,25	3,69	0,34	17,98
	P K	7,39	2,69	2,74	189,59
	S K	1,62	2,36	0,69	37,57
	Cl K	4,72	1,89	2,49	198,68
	K K	8,89	1,21	7,34	376,33
	Ca K	0,58	1,04	0,56	27,29

Tabla 11. Resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en queratinocitos [Queratinocitos 6 a 10].

Nº Queratinocito	Elemento	CPS	Background	P/B	mmol/kg
6	Na K	1,00	3,68	0,27	22,89
	Mg K	1,46	3,91	0,37	19,57
	P K	10,93	3,03	3,61	249,79
	S K	1,39	2,30	0,60	32,67
	Cl K	2,49	1,60	1,56	124,48
	K K	7,89	1,50	5,26	269,69
	Ca K	0,12	1,40	0,09	4,39
7	Na K	2,30	2,16	1,06	89,86
	Mg K	1,31	2,16	0,61	32,26
	P K	8,91	2,06	4,34	300,31
	S K	1,48	1,63	0,91	49,55
	Cl K	4,03	1,38	2,93	233,79
	K K	10,49	1,07	9,85	505,02
	Ca K	0,41	0,75	0,54	26,31
8	Na K	0,90	1,95	0,46	38,99
	Mg K	0,76	2,09	0,36	19,04
	P K	4,70	1,45	3,24	224,19
	S K	1,28	1,13	1,13	61,53
	Cl K	3,56	0,88	4,06	323,96
	K K	7,47	0,62	12,15	622,94
	Ca K	0,28	0,60	0,47	22,90
9	Na K	1,82	4,03	0,45	38,15
	Mg K	1,35	4,13	0,33	17,45
	P K	11,05	3,42	3,23	223,50
	S K	1,87	2,63	0,71	38,66
	Cl K	4,47	1,98	2,26	180,33
	K K	9,02	1,39	6,49	332,75
	Ca K	0,11	1,20	0,09	4,39
10	Na K	2,12	3,55	0,60	50,86
	Mg K	1,30	3,64	0,36	19,04
	P K	8,81	2,60	3,39	234,57
	S K	2,37	2,10	1,13	61,53
	Cl K	4,01	1,71	2,35	187,51
	K K	8,95	1,14	7,86	402,99
	Ca K	0,19	1,26	0,15	7,31

Tabla 12. Resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en queratinocitos [Queratinocitos 11 a 15].

Nº Queratinocito	Elemento	CPS	Background	P/B	mmol/kg
11	Na K	0,37	9,94	0,39	33,06
	Mg K	0,47	1,33	0,35	18,51
	P K	6,61	1,73	3,83	265,02
	S K	1,36	1,42	0,95	51,73
	Cl K	3,62	1,16	3,11	248,16
	K K	9,98	0,98	10,18	521,94
	Ca K	0,49	0,74	0,67	32,65
12	Na K	1,07	3,71	0,29	24,58
	Mg K	1,41	3,20	0,44	23,27
	P K	10,88	2,37	4,60	318,30
	S K	1,42	1,90	0,75	40,84
	Cl K	2,99	1,40	2,14	170,76
	K K	9,38	1,02	9,19	471,18
	Ca K	0,00	0,96	0,00	0
13	Na K	1,87	4,49	0,42	35,60
	Mg K	2,01	4,99	0,40	21,15
	P K	16,86	4,26	3,96	274,01
	S K	1,13	3,07	0,37	20,15
	Cl K	6,43	2,22	2,90	231,40
	K K	16,17	1,86	8,71	446,57
	Ca K	0,23	1,53	0,15	7,31
14	Na K	0,61	2,41	0,25	21,19
	Mg K	1,10	2,56	0,43	22,74
	P K	9,20	2,47	3,72	257,41
	S K	0,52	1,77	0,30	16,34
	Cl K	3,61	1,24	2,91	232,20
	K K	11,36	1,12	10,14	519,89
	Ca K	0,20	0,91	0,22	10,72
15	Na K	1,10	4,62	0,24	20,35
	Mg K	1,17	4,95	0,24	12,69
	P K	10,52	3,51	3,00	207,59
	S K	3,11	2,62	1,19	64,80
	Cl K	2,84	1,95	1,46	116,50
	K K	7,32	1,80	4,05	207,65
	Ca K	0,29	1,29	0,22	10,72

Tabla 13. Resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en queratinocitos [Queratinocitos 16 a 20].

Nº Queratinocito	Elemento	CPS	Background	P/B	mmol/kg
16	Na K	1,38	4,03	0,34	28,82
	Mg K	1,92	4,36	0,44	23,27
	P K	14,28	3,54	4,04	279,55
	S K	1,96	2,72	0,72	39,20
	Cl K	2,90	1,99	1,46	116,50
	K K	10,42	1,53	6,81	349,16
	Ca K	0,30	1,35	0,22	10,72
17	Na K	0,96	4,68	0,21	17,80
	Mg K	1,58	4,68	0,34	17,980
	P K	16,02	4,20	3,81	263,63
	S K	1,42	2,98	0,48	26,14
	Cl K	2,67	1,98	1,39	107,72
	K K	10,28	1,63	6,29	322,49
	Ca K	0,53	1,25	0,42	20,47
18	Na K	1,88	1,77	1,06	89,86
	Mg K	0,91	1,91	0,48	25,38
	P K	6,29	1,62	3,87	267,78
	S K	1,13	1,30	0,87	47,37
	Cl K	2,44	1,00	2,45	195,49
	K K	5,45	0,78	6,98	357,87
	Ca K	0,27	0,72	0,38	18,52
19	Na K	0,88	3,30	0,27	22,89
	Mg K	1,45	3,60	0,40	21,15
	P K	7,07	2,58	2,75	190,29
	S K	2,92	2,16	1,35	73,51
	Cl K	3,13	1,82	1,72	137,24
	K K	6,57	1,40	4,68	239,95
	Ca K	0,20	1,21	0,17	8,28
20	Na K	1,41	3,58	0,40	33,91
	Mg K	1,74	3,56	0,49	25,91
	P K	9,43	2,89	3,26	225,58
	S K	2,30	2,18	1,05	57,17
	Cl K	1,88	1,67	1,12	89,37
	K K	5,12	1,32	3,88	198,93
	Ca K	0,24	1,18	0,20	9,75

Tabla 14. Resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en queratinocitos [Queratinocitos 21 a 25].

Nº Queratinocito	Elemento	CPS	Background	P/B	mmol/kg
21	Na K	1,50	2,86	0,53	44,93
	Mg K	1,13	2,64	0,43	22,74
	P K	9,62	2,25	4,28	296,15
	S K	0,94	1,79	0,53	28,86
	Cl K	2,66	1,28	2,07	165,17
	K K	9,45	0,84	11,26	577,31
	Ca K	0,41	0,72	0,57	27,78
22	Na K	1,00	3,70	0,27	22,89
	Mg K	1,30	3,48	0,37	19,57
	P K	15,61	2,79	5,60	387,49
	S K	0,86	2,15	0,40	21,78
	Cl K	2,54	1,52	1,66	132,46
	K K	10,62	1,14	9,32	477,85
	Ca K	0,00	1,14	0,00	0
23	Na K	2,04	3,48	0,59	50,01
	Mg K	1,88	3,61	0,52	27,50
	P K	9,52	3,05	3,12	215,89
	S K	1,97	2,38	0,83	45,19
	Cl K	2,11	1,84	1,15	91,76
	K K	5,44	1,32	4,12	211,24
	Ca K	0,18	1,20	0,15	7,31
24	Na K	0,54	3,87	0,14	11,87
	Mg K	1,28	3,87	0,33	17,45
	P K	7,01	2,80	2,50	172,99
	S K	2,87	2,28	1,26	68,61
	Cl K	2,99	1,92	1,55	123,68
	K K	7,46	1,30	5,72	293,27
	Ca K	0,44	1,06	0,42	20,47
25	Na K	1,54	4,26	0,36	30,52
	Mg K	0,78	4,70	0,17	8,99
	P K	11,11	3,28	3,39	234,57
	S K	2,45	2,52	0,97	52,82
	Cl K	4,18	1,98	2,11	168,36
	K K	10,09	1,52	6,63	339,93
	Ca K	0,58	1,24	0,47	22,90

Tabla 15. Resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X en queratinocitos [Queratinocitos 26 a 30].

Nº Queratinocito	Elemento	CPS	Background	P/B	mmol/kg
26	Na K	1,37	4,05	0,34	28,82
	Mg K	1,68	4,09	0,41	21,68
	P K	12,14	2,67	4,55	314,84
	S K	2,30	2,04	1,13	61,53
	Cl K	3,38	1,60	2,12	169,16
	K K	10,42	1,36	7,69	394,27
	Ca K	0,36	1,26	0,29	14,13
27	Na K	1,52	1,83	0,83	70,36
	Mg K	1,02	2,02	0,51	26,97
	P K	5,09	1,74	2,93	202,74
	S K	1,26	1,38	0,92	50,09
	Cl K	1,79	1,02	1,75	139,64
	K K	5,22	0,85	6,18	316,85
	Ca K	0,22	0,72	0,31	15,11
28	Na K	1,52	4,25	0,36	30,52
	Mg K	1,34	4,07	0,33	17,45
	P K	12,52	2,90	4,32	298,92
	S K	1,62	2,24	0,73	39,75
	Cl K	4,76	1,85	2,58	205,87
	K K	9,60	1,26	7,62	390,69
	Ca K	0,35	1,20	0,30	14,62
29	Na K	1,50	3,35	0,45	38,15
	Mg K	1,65	3,64	0,45	23,80
	P K	10,89	2,45	4,44	307,23
	S K	2,36	1,97	1,20	65,34
	Cl K	2,83	1,75	1,61	128,47
	K K	8,45	1,32	6,41	328,65
	Ca K	0,21	1,26	0,17	8,28
30	Na K	0,43	4,39	0,10	8,48
	Mg K	1,14	4,03	0,28	14,81
	P K	10,99	3,03	3,63	251,18
	S K	2,27	2,36	0,96	52,27
	Cl K	3,66	1,82	2,01	160,38
	K K	8,30	1,38	6,02	308,65
	Ca K	0,45	1,07	0,42	20,47

Tablas 16 y 17. Medias (M) y Desviaciones Estándar (DE) de cada elemento cuantificado en el total de fibroblastos y queratinocitos.

#### FIBROBLASTOS

ELEMENTO	MEDIA (M)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DE)
Sodio [Na]	47,10	15,22
Magnesio[Mg]	20,27	7,93
Fósforo [P]	308,49	49,97
Azufre [S]	71,04	12,28
Cloro [Cl]	179,27	22,84
Potasio [K]	398,19	47,94
Calcio [Ca]	13,61	7,97

#### QUERATINOCITOS

ELEMENTO	MEDIA (M)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DE)
Sodio [Na]	35,52	19,76
Magnesio[Mg]	20,57	4,58
Fósforo [P]	251,77	47,86
Azufre [S]	45,43	15,25
Cloro [Cl]	170,76	53,73
Potasio [K]	370,93	108,67
Calcio [Ca]	15,28	9,05

### **3. EQUIVALENTES DE MUCOSA ORAL DE ESPESOR COMPLETO OBTENIDOS MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR**

Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral ha sido la elaboración de sustitutos o equivalentes de mucosa oral de espesor completo, los cuales se desarrollaron siguiendo una técnica de cultivo secuencial. Para asegurar una adecuada inmersión del cultivo así como una correcta diferenciación del epitelio multilaminar se utilizó una técnica de cultivo interfase aire-líquido, para lo cual se emplearon soportes porosos sobre los que se logró un adecuado crecimiento y adhesión a los mismos de las células epiteliales, lo que sugiere que los nutrientes y factores de crecimiento del medio de cultivo cruzaron de forma efectiva la membrana y migraron hacia el compartimiento superior de los soportes porosos, donde se encontraban las células, evitando al mismo tiempo la migración celular hacia otro compartimento.

Los cultivos de queratinocitos obtenidos fueron cultivados sobre cada uno de los cuatro tipos de sustitutos estromales desarrollados, obteniéndose equivalentes con diferentes características. A continuación describimos las características de cada uno de ellos.

1- *Geles de agarosa al 2%*. La utilización de este tipo de material generó sustitutos estromales con una adecuada consistencia, que pudieron tallarse con facilidad para generar tejidos artificiales de tamaño y grosor adecuado. Sin embargo, este material no permitió el crecimiento de los fibroblastos en su interior, por lo que fue desechado como biomaterial para la fabricación de sustitutos de mucosa oral de espesor completo. Del mismo modo, los queratinocitos cultivados sobre la superficie de los sustitutos estromales de agarosa pura mostraron muy bajo nivel de adherencia y un crecimiento muy escaso o nulo.

2- *Geles de fibrina humana*. La fabricación de geles de fibrina resultó técnicamente sencilla, no requiriendo la utilización de material dependiente de temperatura. Una vez solidificados, los geles de fibrina permitieron el crecimiento de los fibroblastos inmersos en su espesor y de las células epiteliales sembradas en su superficie.

La consistencia de los geles de fibrina fue relativamente baja, el sustituto obtenido presentaba una gran friabilidad lo que dificultaba su manejo y limitaba su potencial de cara a una posible utilidad clínica.

3- *Geles de colágeno tipo I*. La producción de geles de colágeno tipo I fue técnicamente sencilla. Una vez solidificados, los geles de colágeno tipo I presentaron varios problemas. El más importante de ellos fue la tendencia a la contracción y a la pérdida de volumen de este tipo de sustitutos estromales. Tras 7 días de cultivo con queratinocitos en su interior, todos los geles de colágeno se contrajeron y perdieron entre un 25 y un 50% de su volumen original. Sin embargo, los geles de colágeno tipo I permitieron el crecimiento de fibroblastos estromales en su espesor y de queratinocitos en su superficie. Los índices de consistencia y de resistencia a la manipulación fueron adecuados.

4- *Geles de fibrina y agarosa al 0.1%*. Los geles de fibrina humana a la cual se añadió agarosa hasta una concentración final del 0.1% presentaron una buena consistencia a lo que se unió una adecuada resistencia lo cual facilitó el manejo y la manipulación de los mismos. Los fibroblastos mostraron unos buenos índices de supervivencia y proliferación en el interior de los sustitutos estromales. Después de 2 días de cultivo, los queratinocitos incorporados dentro de los geles de fibrina y agarosa al 0,1%, mostraron una morfología elongada o estrellada, apareciendo extendidos por toda la superficie de la malla estromal. En ninguno de los casos se apreció contracción o pérdida de volumen de los geles de fibrina y agarosa después de generar los sustitutos de mucosa oral.

#### **4. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL.**

Los resultados microscópicos tienen por base los estudios sobre equivalente de mucosa oral construidos con un sustrato de fibrina y agarosa. Mediante el uso de microscopía óptica se evidencia que durante la primera semana el constructo está revestido por una capa de células epiteliales (Figura 23) que comienzan a estratificarse al final de dicha semana, contando en ese momento con dos hileras celulares (Figura 24). Puede asimismo observarse que el proceso de estratificación sigue desarrollándose en la segunda y tercera semana posteriores a la elaboración del constructo, alcanzando en el estadio final de la tercera semana un nivel de estratificación significativo (Figuras 25 y 26).

En el estroma podemos observar poco desarrollo del componente fibroblástico a lo largo de las tres primeras semanas (Figuras 23-26) .

Con microscopía electrónica de transmisión los cambios observados son más significativos, evidenciándose a nivel epitelial que en la primera semana el

revestimiento es en monocapa y que las células presentan microvellosidades de longitud variable. El núcleo se encuentra formado por cromatina dispuesta en básicamente en forma de eucromatina y en el citoplasma aparecen algunos cuerpos residuales (Figuras 27 y 28). Al final de la primera semana se puede observar el desarrollo de la membrana basal que aparece constituida por su lámina lúcida y lámina densa, ésta última todavía incompleta (Figura 29). Durante la segunda y tercera semana comienza a estratificarse el epitelio y a aparecer sistemas de unión de naturaleza desmosómica así como interdigitaciones entre las células epiteliales (Figuras 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 y 39).

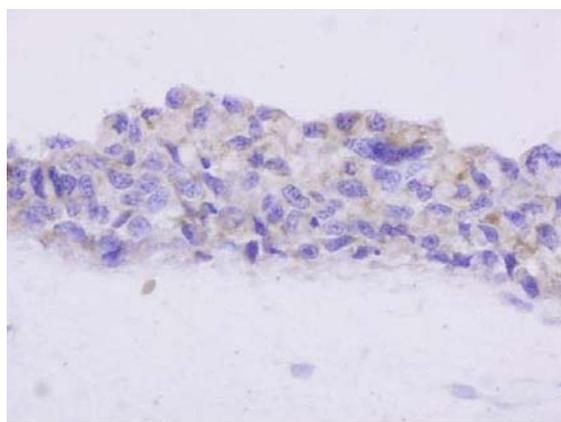
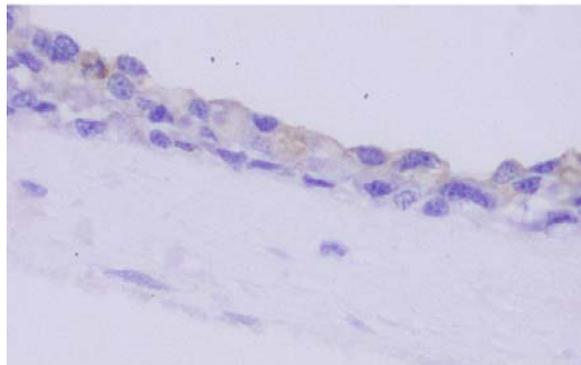
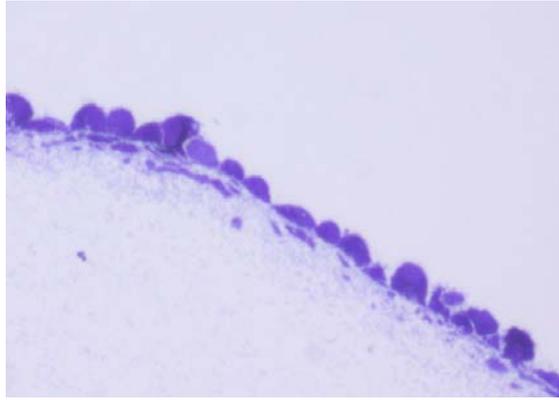
La membrana basal continúa desarrollándose y comienzan a aparecer elementos de anclaje en el estroma subyacente (Figuras 33, 40, 41 y 42). Asimismo algunas organelas alcanzan un notable grado de desarrollo como por ejemplo ocurre con el aparato de Golgi (Figura 43). Las células más superficiales presentan expansiones periféricas hacia el exterior que se corresponden con microplicas (Figura 33).

El estroma al microscopio electrónico de transmisión muestra la presencia de fibroblastos inmersos en un retículo de fibrina. Los fibroblastos muestran una ultra estructura ortotípica, si bien presentan elementos de tipo vacuolar intracitoplasmáticos (Figuras 44 y 45).

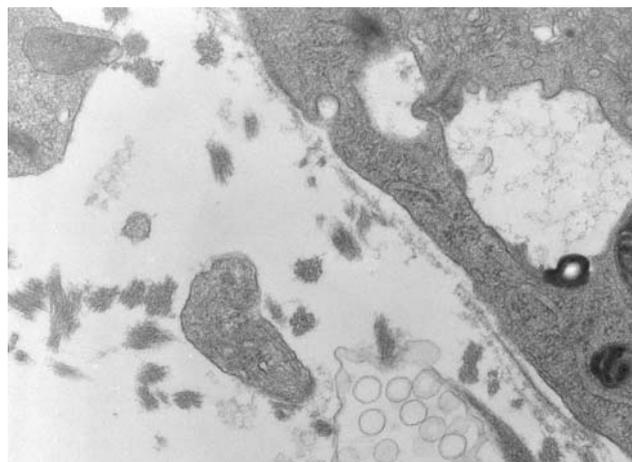
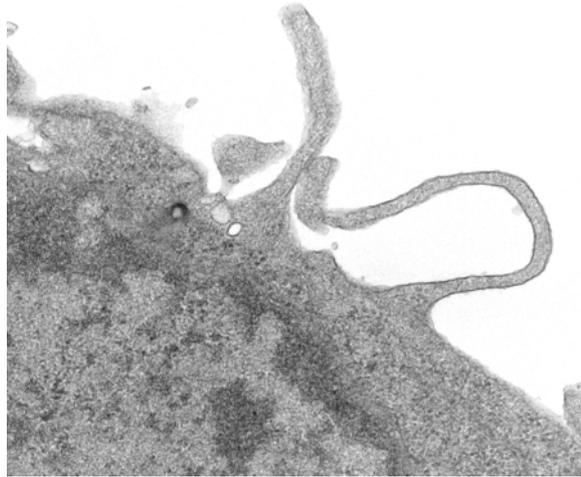
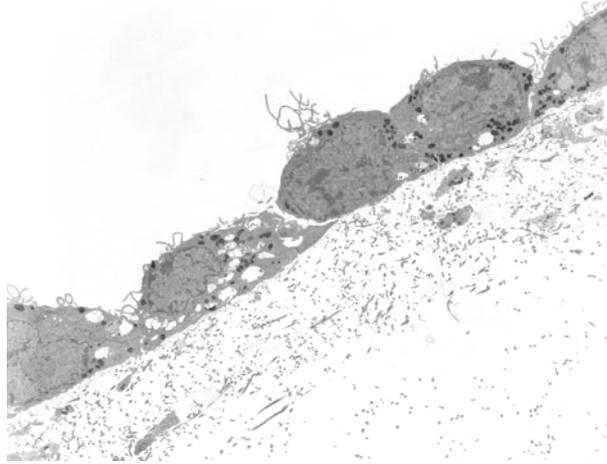
A partir de la segunda semana comienzan a visualizarse algunas microfibrillas de colágena (Figura 46). Los fibroblastos no configuran ninguna estructura específica en relación con el soporte sobre el que asienta el estroma (Figura 47).

Con microscopía electrónica de barrido es posible observar que durante la primera semana las células epiteliales no recubren completamente la superficie del constructo, lo que permite visualizar el estroma subyacente (Figura 48).

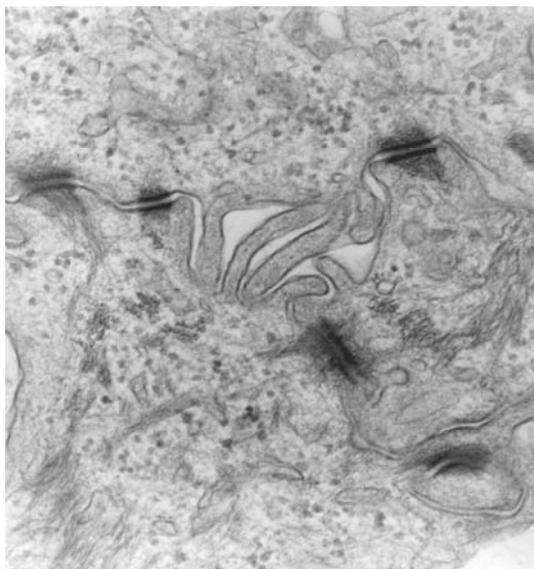
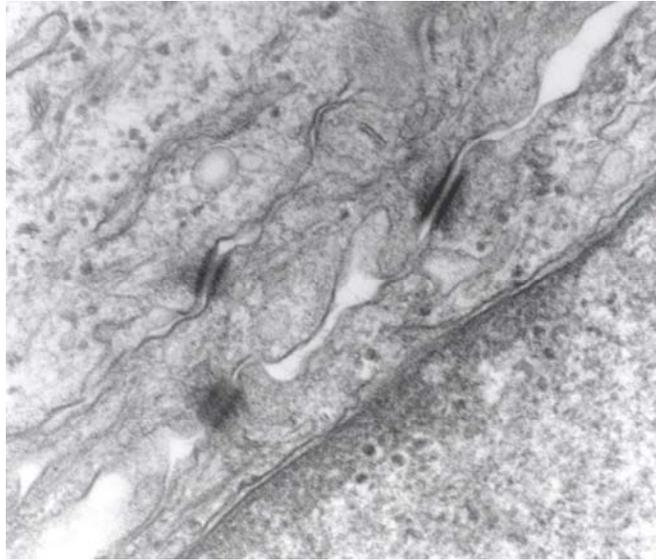
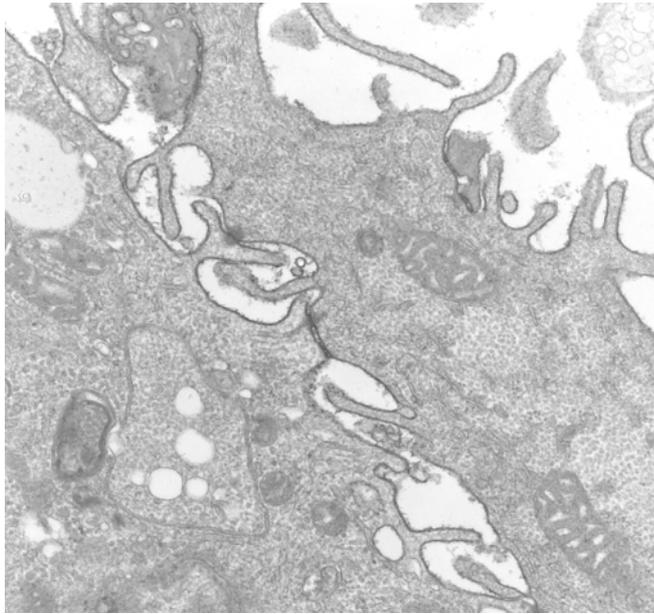
Las células muestran una morfología esférica y una superficie prácticamente lisa, pudiendo observarse en algunos elementos pequeños microvillis (Figura 49). Durante la segunda semana las células superficiales mantienen la morfología esferoidea pero su superficie aparece recubierta con numerosas microvellosidades, las células presentan por tanto un patrón microscópico tipo I (Figura 50). En la tercera semana la superficie está constituida por células de morfología variable esferoideas, poligonales o fusiformes, cuya superficie está recubierta fundamentalmente por microplicas configurando patrones tipo II y III (Figura 51). Con microscopía electrónica de barrido, el estroma muestra una imagen que se caracteriza por la presencia de fibroblastos, básicamente estrellados inmersos en un espeso retículo de fibrina (Figura 52).



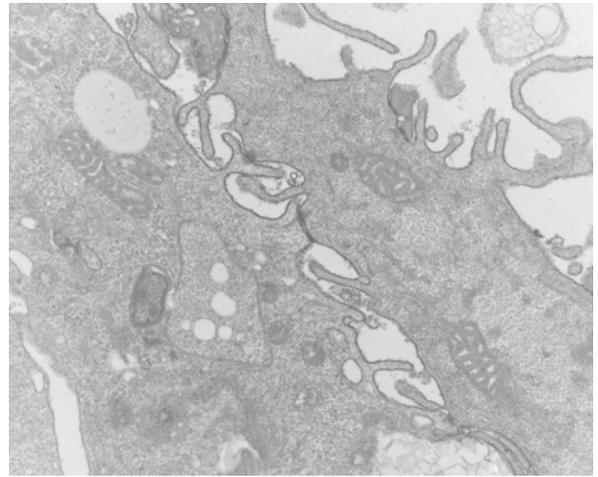
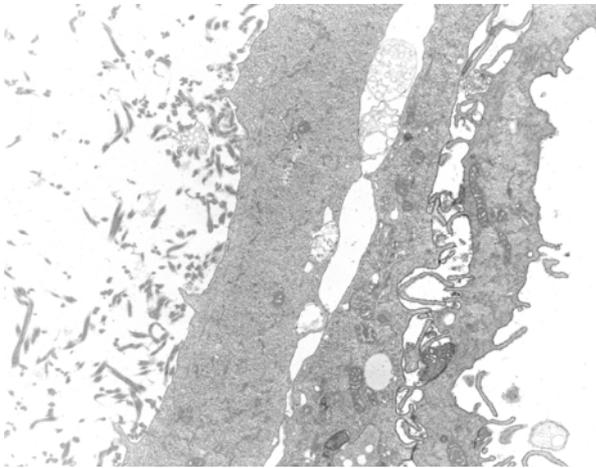
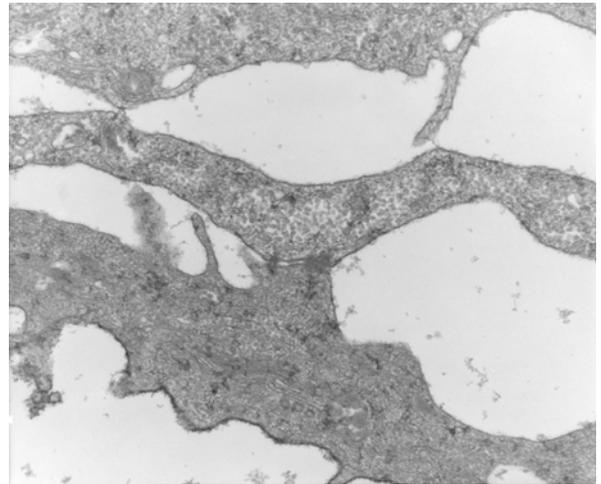
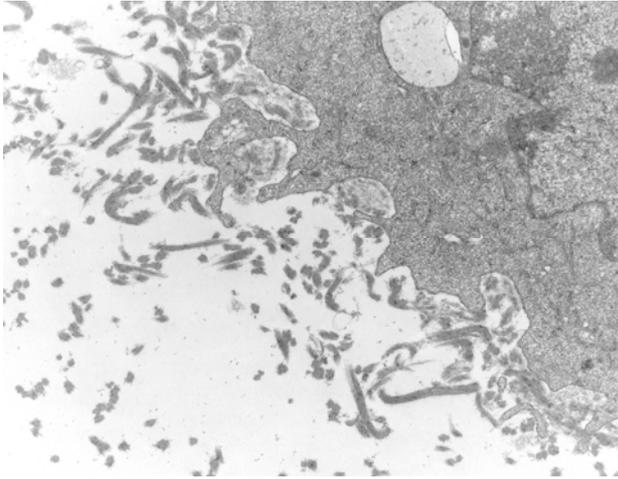
Figuras 23, 24 25 y 26. Mucosa Oral Artificial (M.O.). Estratificación progresiva en semanas 1, 2, 3 y 4.



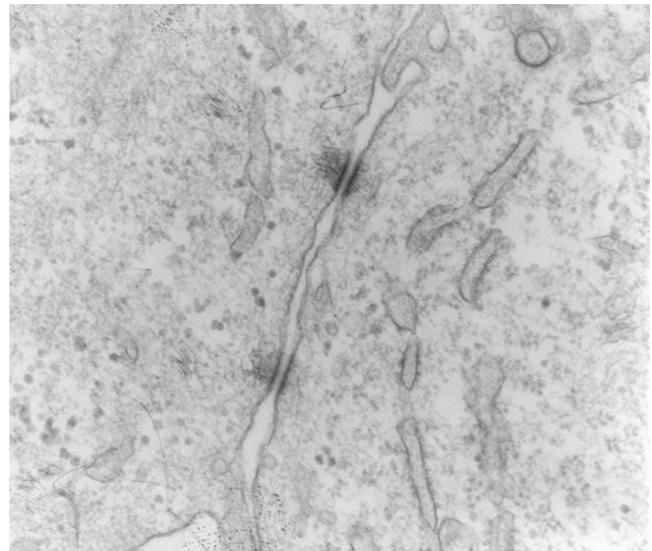
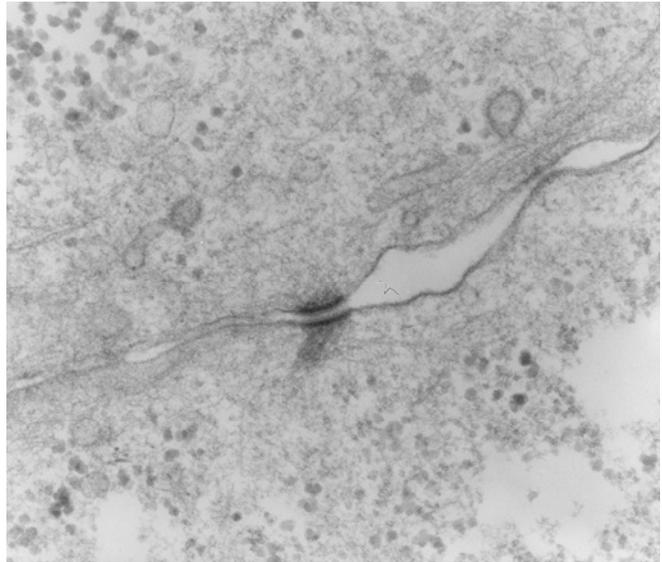
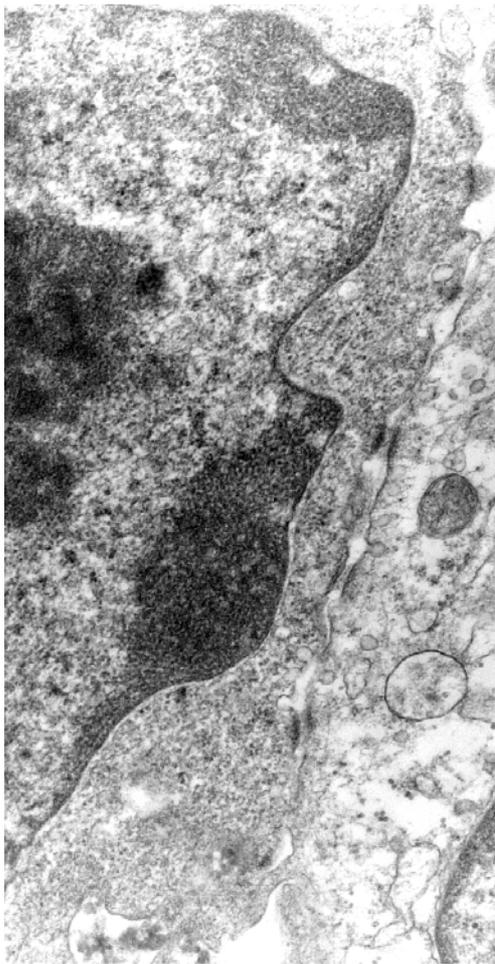
Figuras 27, 28 y 29. Mucosa Oral Artificial (M.E.T.). Semana 1.



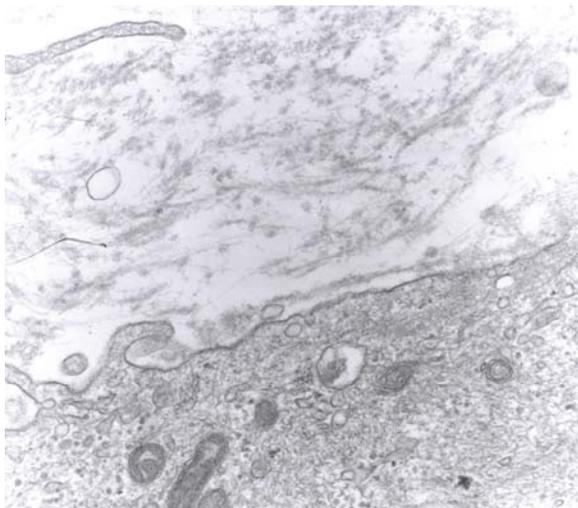
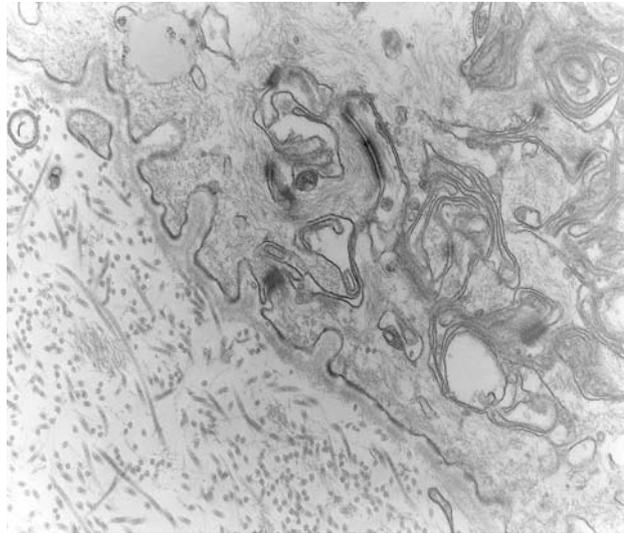
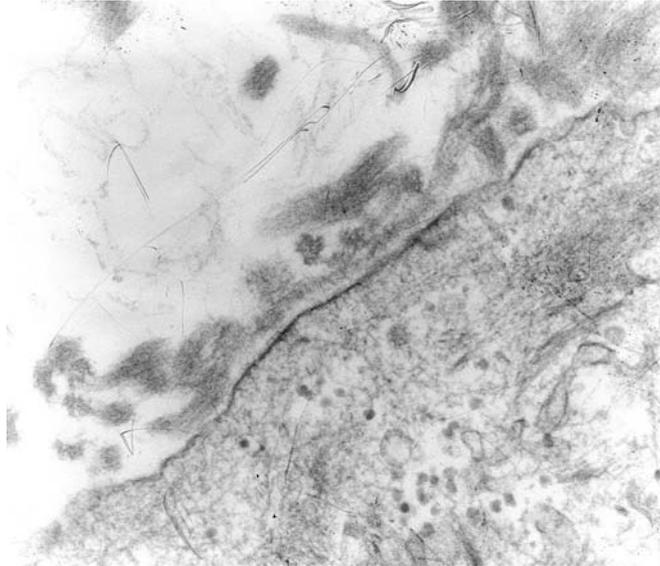
Figuras 30, 31 y 32. Mucosa Oral Artificial (M.E.T.). Semana 2.



Figuras 33, 34, 35 y 36. Mucosa Oral Artificial (M.E.T.). Semana 3.



Figuras 37, 38 y 39. Mucosa Oral Artificial (M.E.T.). Semana 3.



Figuras 40, 41 y 42. Mucosa Oral Artificial (M.E.T.). Semanas 3 y 4.

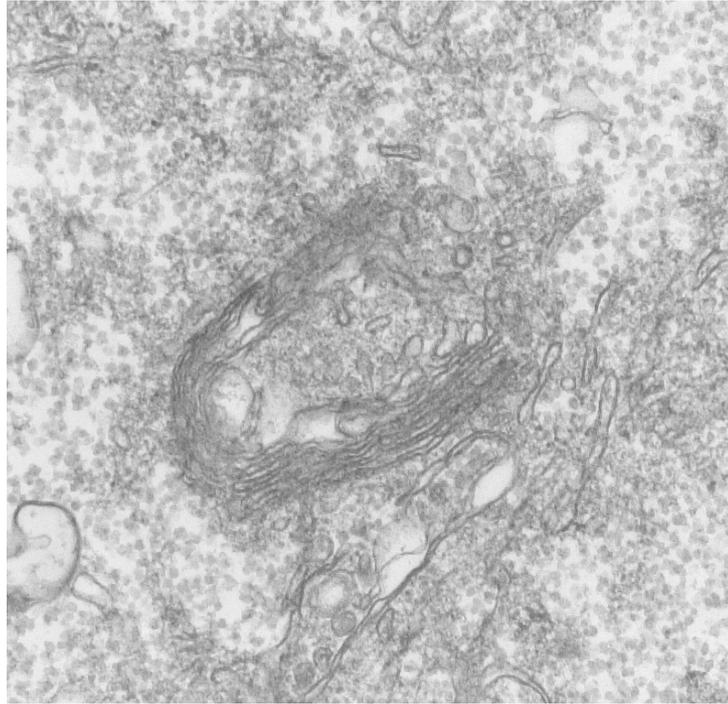
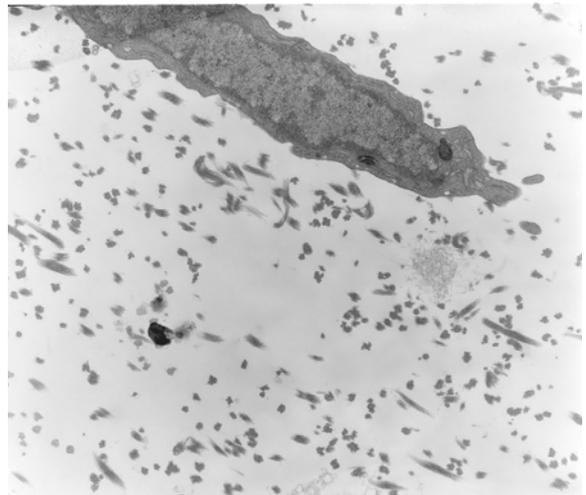
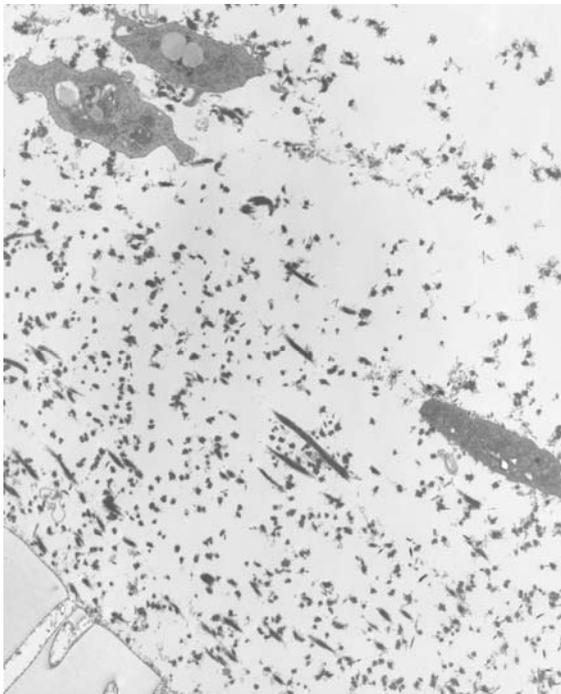
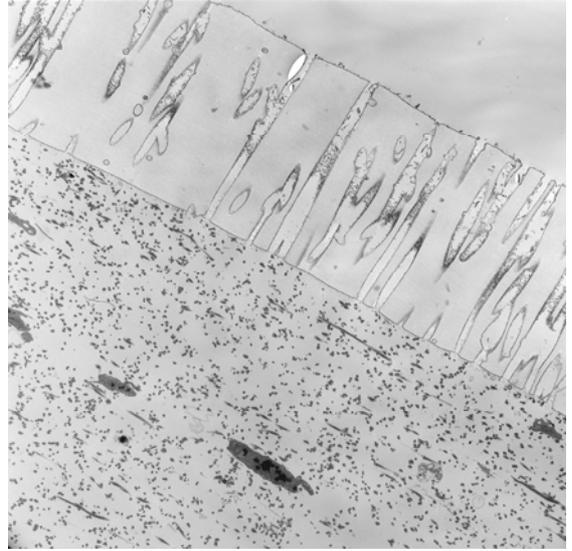
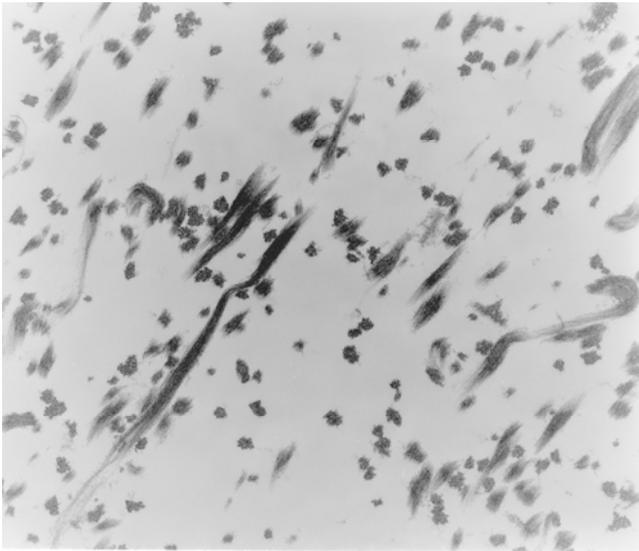


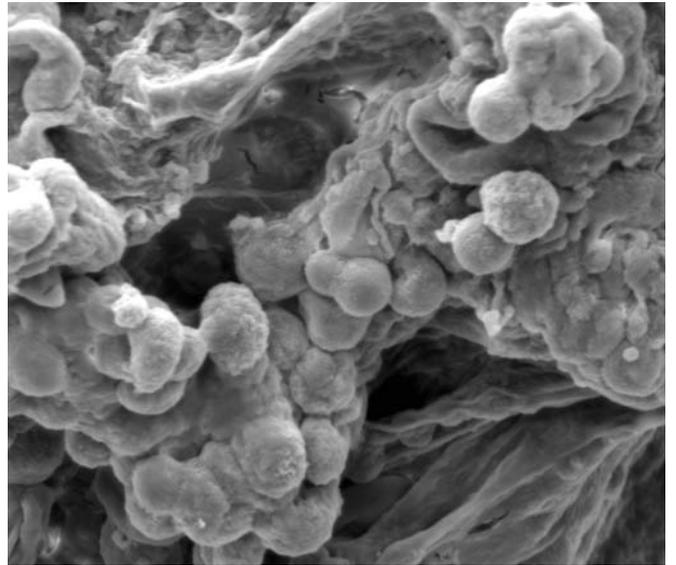
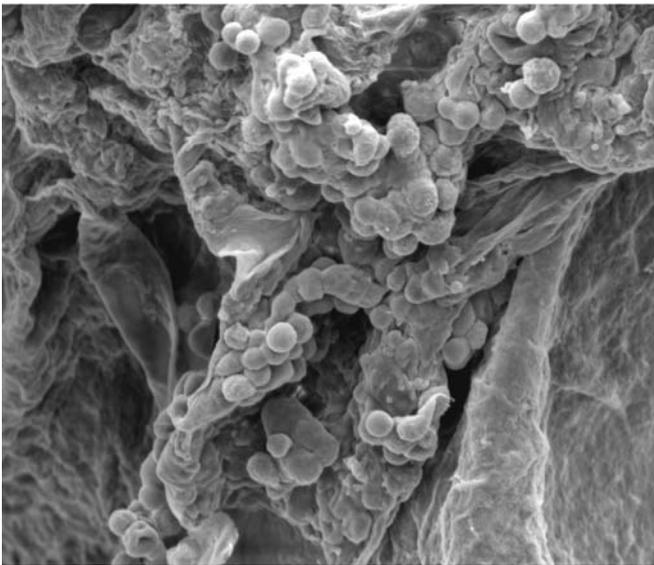
Figura 43. Mucosa Oral Artificial (M.E.T.). Aparato de Golgi. Semana 2.



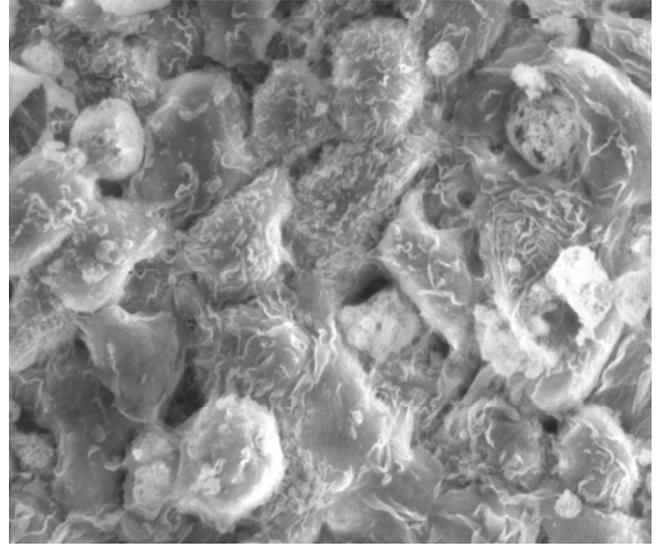
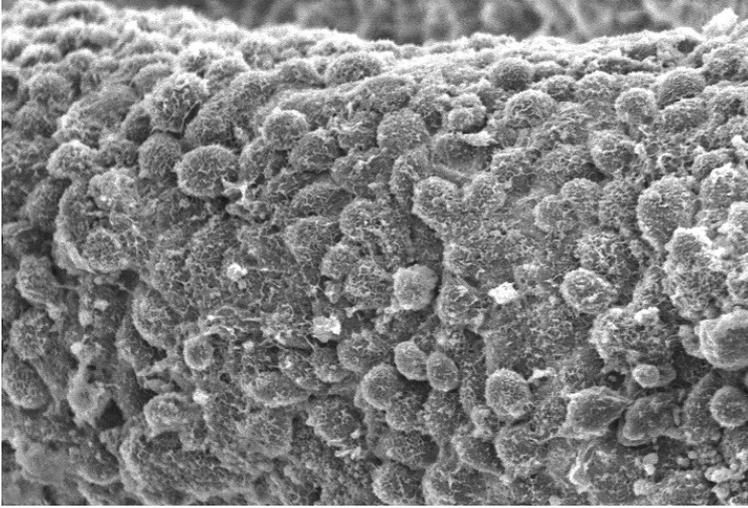
Figuras 44 y 45. Mucosa Oral Artificial (M.E.T.). Semana 3.



Figuras 46 y 47. Mucosa Oral Artificial (M.E.T.). Semana 3.



Figuras 48 y 49.. Mucosa Oral Artificial (M.E.B.). Semana 1.



Figuras 50 y 51. Mucosa Oral Artificial (M.E.B.). Semanas 2 y 3.

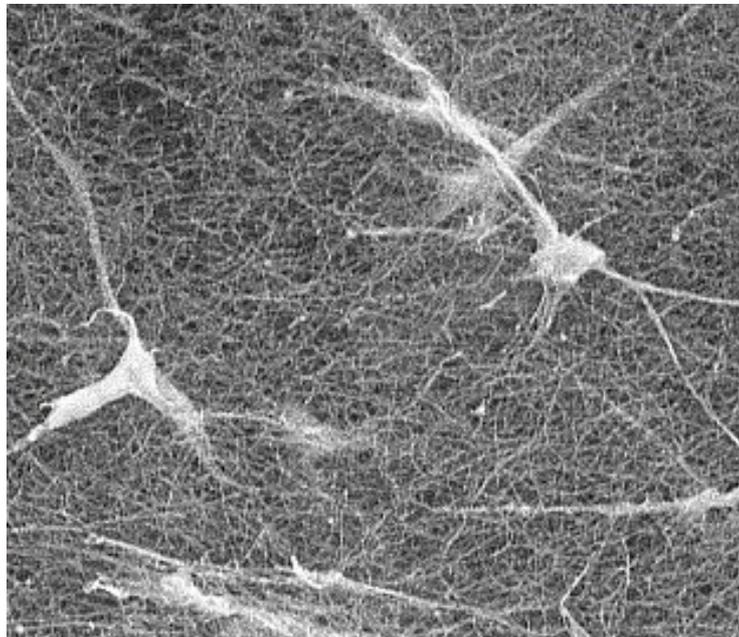


Figura 52. Mucosa Oral Artificial (M.E.B.) Semana 3.

## **DISCUSIÓN**

De acuerdo con lo indicado en el capítulo introductorio, uno de los retos fundamentales de la Cirugía Oral y Maxilofacial es la búsqueda de sustitutos equivalentes de mucosa oral, a través de protocolos de Ingeniería Tisular, con el objeto de reemplazar los defectos mucosos originados en dicha región como consecuencia de lesiones de distinta naturaleza. (Schultze-Mosgau et al., 2004); (Song et al., 2004). Ello se debe a que las técnicas quirúrgicas hasta ahora utilizadas, someramente descritas anteriormente, no satisfacen de manera absoluta los objetivos funcionales y estéticos a cubrir. Buen ejemplo de ello, son las complicaciones secundarias acaecidas tras el empleo de injertos cutáneos, teóricamente de gran utilidad, tales como el crecimiento intraoral de estructuras anexas o la excesiva queratinización superficial del injerto (Toft et al., 2000); (Chien et al., 2005).

Desde hace unos años, la Ingeniería Tisular ha logrado elaborar distintos tipos de estructuras histológicas capaces de ser utilizadas, con un notable éxito, para finalidades terapéuticas. A este respecto destacan las aportaciones realizadas en piel (Meana et al., 1998); (Llames et al., 2004, 2006), cornea (Nishida, 2003); (Alaminos et al., 2006), urotelio (Wunsch et al., 2005) y vasos sanguíneos (Pascual et al., 2004). En mucosa oral asimismo se han propuesto algunos protocolos de Ingeniería Tisular para la construcción de mucosa oral artificial (Schultze-Mosgau et al., 2004); (Song et al., 2004); (Lauer 2001b) Si bien no existe aun un modelo capaz de satisfacer de modo absoluto los requerimientos fundamentales que exige un tejido artificial destinado a su uso terapéutico.

Las áreas principales de investigación se centran básicamente en la viabilidad de las células a utilizar, en la naturaleza del estroma y en la diferenciación tisular del constructo. A este respecto la presente Tesis Doctoral aborda el estudio de las características histológicas de una mucosa oral de espesor completo obtenida mediante Ingeniería Tisular haciendo hincapié en el estudio de la viabilidad celular y de la naturaleza del estroma. En relación con la viabilidad celular es importante reseñar que existen distintos métodos para llevar a cabo su estudio, dichos métodos están basados en criterios morfológicos, bioquímicos y metabólicos. Los más utilizados están vinculados a métodos basados en la perturbación de la permeabilidad de la membrana. Estos métodos son fundamentalmente dos: a) métodos basados en el empleo de colorantes y b) métodos basados en la determinación de la liberación de moléculas, fundamentalmente enzimas, en el medio extracelular.

El principio básico de los primeros, consiste en utilizar un colorante, que en función de sus características, penetra y colorea las células vivas o muertas. La proporción relativa de las células coloreadas o no, refleja el número exacto de células vivas o muertas, y en consecuencia la viabilidad del conjunto de la población celular. El conteo de las diferentes poblaciones celulares puede ser efectuado por métodos microscópicos, citometría de flujo, espectrofotometría y por espectrofluorimetría automatizada (Slater, 2001); (Chen y Wargner 2001)

Por otra parte, y haciendo referencia al punto b, los métodos basados en la medición de la liberación de moléculas intracelulares, están fundamentados, asimismo, en las alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular bajo la acción de los tóxicos. Dichos métodos comprenden dos tipos de ensayos, uno enzimático y otro radioactivo. El método enzimático está basado en la medición del enzima citosólico láctico deshidrogenada (LDH), enzima que es liberada al medio extracelular tras alteraciones graves de la membrana plasmática. En efecto la alteración de la membrana plasmática induce la liberación de las enzimas citosólicas, como la deshidrogenasa láctica, al medio extracelular. El método radioactivo se basa en la medida de la liberación del Cr51, isótopo radioactivo que se une de manera no covalente a los aminoácidos básicos de las proteínas intracelulares. Las células muertas liberan el Cr51 en el medio extracelular el cual puede ser cuantificado por un contador gamma.

En nuestro estudio hemos utilizado el azul tripán tanto en queratinocitos como fibroblastos obtenidos a partir de las muestras de biopsia, comprobando una alta viabilidad en dichos elementos. La experiencia desarrollada por el grupo de investigación de Ingeniería Tisular en la utilización de técnicas de microscopía electrónica analítica aplicables al estudio de la viabilidad celular ha hecho que asimismo utilicemos dicha metodología para confirmar la viabilidad de estos elementos celulares, elementos que van a ser utilizados posteriormente para la construcción de nuestro modelo de mucosa oral artificial.

Como es sabido, el estudio de la viabilidad celular con colorantes, como el azul tripán, o mediante la liberación de enzimas, exige la ruptura de la membrana celular. Sin embargo como han demostrado los estudios de nuestro grupo la evaluación con microscopía electrónica analítica, no exige la ruptura de la membrana y por tanto los criterios de viabilidad alcanzan un mayor grado de exactitud y predicción (Fernández-Segura et al., 1997, 1999); (Arrebola et al., 2005); (Rodríguez Morata 2005); (Rodríguez IA, 2005); (Alaminos et al., 2006p)

Es necesario evaluar la metodología a utilizar en la microscopía electrónica analítica, ya que uno de los principales inconvenientes al utilizar células en cultivo completas, no seccionadas, lo constituye el medio de cultivo, el cual debe ser eliminado para que no

interfiera con el microanálisis de las células. Esta eliminación debe realizarse previamente al proceso de criopreparación mediante el lavado de las células con soluciones lavadoras, las cuales deben eliminar de una manera efectiva el medio de cultivo, no deben interferir con el análisis y no deben alterar la permeabilidad de la membrana plasmática o causar alteración y redistribución de la composición iónica intracelular (Warley et al., 1997); (Zierold et al., 1998). Para ello se han empleado tres tipos de soluciones: 1) soluciones isotónicas volátiles como el acetato de amonio, 2) soluciones isotónicas no volátiles como la sacarosa y el manitol y 3) agua destilada. Desde el punto de vista fisiológico, las soluciones isotónicas deben de ser las soluciones lavadoras más efectivas debido al escaso riesgo de efectos osmóticos. Paradójicamente diferentes grupos de investigación han demostrado, a este respecto, que el agua destilada a 4°C constituye, desde el punto de vista morfológico y microanalítico, la solución lavadora más efectiva (Roomans, 1991); (Warley et al., 1994b); (Fernández-Segura et al., 1997a), solución que fue por tanto utilizada en la presente Tesis Doctoral.

Como hemos comentado anteriormente, la aplicación del microanálisis por energía dispersiva de rayos X al material biológico requiere la elección de métodos de preparación que eviten o reduzcan la pérdida y/o redistribución de los diferentes elementos y en especial de los elementos difusibles. A este respecto, los métodos convencionales de preparación de muestras biológicas para microscopía electrónica – y que tienen por base la utilización de fijadores químicos, la deshidratación, la inclusión en material plástico, la polimerización a altas temperaturas y el ultracorte- no constituyen un procedimiento adecuado para preservar la integridad del contenido de los elementos a analizar. Por el contrario, las técnicas de crio-preparación constituyen, en la actualidad, los métodos ideales para el estudio de la composición elemental, y muy especialmente de los elementos difusibles, de células y tejidos, mediante técnicas microanalíticas (Zierold et al., 1988); (Warley, 1997); (Warley y Skepper, 2000); (Fernández Segura, 1999). En nuestra opinión, las células aisladas y en cultivo, constituyen los especímenes biológicos más adecuados para llevar a cabo los procedimientos de criopreparación. Esta característica radica en el pequeño tamaño de las muestras, que permite un procesamiento con escaso número de artefactos analíticos debido sobre todo a la escasa aparición y grado de extensión de los cristales de hielo. En relación con los métodos de cuantificación en muestras biológicas se pueden distinguir, fundamentalmente, dos métodos: 1) métodos de medida de la masa elemental por unidad de masa -método de la normalización del fondo- y 2) método del estándar periférico (Rick et al., 1979). El método más utilizado es el método de la normalización del fondo o método de Hall et al (Hall et al., 1973) desarrollado

inicialmente para secciones finas y para microscopía electrónica de transmisión. El fundamento de este método es que la concentración de un elemento en el área de análisis es proporcional al número de cuentas netas bajo el pico característico de ese elemento, mientras que la radiación de fondo o blanca es una medida de la masa total en el área del análisis. A este respecto, cuando se analizan especímenes criodisecados, los datos cuantitativos son obtenidos en mmol/kg masa seca; por el contrario, cuando el material es analizado en un estado congelado e hidratado los datos son obtenidos en mmol/kg masa húmeda.

No obstante, el método de la normalización del fondo no constituye un procedimiento apropiado para el análisis cuantitativo de especímenes gruesos. Por este motivo, diferentes autores han propuesto una extensión del método de Hall: el método de la razón pico/fondo (P/B) (Staham y Pawley, 1978); (Boekestein et al., 1984), En la presente Tesis utilizamos este método ya que la señal de fondo es medida por debajo del pico característico de cada elemento, en vez de elegir una región del espectro de rayos X libre de picos (4.2-6.2 KeV). Por tanto, el fundamento del método de la razón P/B implica que la concentración de un elemento en el área de análisis en la muestra es proporcional al número de cuentas netas de la señal característica de ese elemento dividido por el fondo existente debajo de pico. El interés del método P/B es que resulta independiente de las variaciones en la intensidad de corriente, así como de la absorción debida a las irregularidades de la superficie de la muestra siendo, por tanto, el método de elección para el análisis cuantitativo de la composición elemental de especímenes biológicos gruesos examinados en un microscopio electrónico de barrido.

El estudio cuantitativo por microscopía electrónica analítica, tras las consideraciones metodológicas que se acaban de indicar, permite determinar, utilizando energía dispersiva de rayos X, el perfil iónico de las células y la cuantificación de los elementos químicos de la misma, fundamentalmente el sodio, el potasio y el cloro, que son los más vinculados a la definición de su estado biológico.

En efecto diferentes autores han demostrado que las concentraciones intracelulares de potasio, sodio y cloro y el índice potasio/sodio son excelentes marcadores de la viabilidad celular (Warley, 1994b); (Roomans, 2002), (Alaminos, 2006p)

En nuestro estudio hemos determinado en los queratinocitos y fibroblastos procedentes de biopsias, el contenido de sodio, magnesio, fósforo, cloro, azufre, potasio y calcio, utilizando para ello microscopía electrónica analítica siguiendo las técnicas y protocolos descritos en el capítulo de Material y Métodos.

Nuestros resultados revelan que los perfiles iónicos de los queratinocitos y fibroblastos de los cultivos primarios poseen un alto grado de viabilidad.

Cifras intracelulares altas de potasio y fósforo son excelentes marcadores, sobre todo si se unen a cifras bajas de sodio (Roomans, 2002); (Arrebola et al., 2005); (Alaminos et al., 2006). Cifras bajas de potasio y cloro son indicadoras de un proceso de apoptosis, pudiendo ser detectadas incluso en las primeras fases de dicho proceso (Barbiero et al., 1995); (Hughes et al., 1997); (Fernández-Segura et al., 1999); (Arrebola et al., 2005;)

En nuestros resultados los indicadores potasio/sodio son también elevados lo que ha de relacionarse asimismo con un alto grado de viabilidad celular.

Uno de los retos futuros de la investigación en este campo es sin duda el mantenimiento o no de dicha viabilidad a lo largo del tiempo, de los subcultivos a utilizar y de las condiciones de preservación y conservación de los cultivos para su uso futuro en Ingeniería Tisular y en terapéutica (Alaminos 2006p)

Una vez considerada la viabilidad de las células a utilizar en la construcción de nuestro modelo de mucosa oral artificial vamos a discutir la construcción de dicha mucosa y sobre todo el uso de los distintos soportes estromales utilizados en la fabricación de la misma.

En relación con los soportes, al igual que otros autores en diferentes tejidos, hemos ensayado la utilización de geles de agarosa, colágena y fibrina (Meana et al., 1998); (Schoop et al., 1999); (Bach et al., 2001); (Chinnathambi et al., 2003); (Llames et al., 2004, 2006); (Isenberg et al., 2006); (Peretti et al., 2006); (Talbot et al., 2006); (Alaminos et al., 2006). Nuestros resultados son en este caso semejantes a los obtenidos por dichos autores.

En efecto cuando se utiliza colágena podemos comprobar como los geles tienden a perder volumen y a contraerse con el tiempo, por lo que el volumen de la mucosa obtenida resulta finalmente de un menor tamaño que el previsto. Los resultados en otros órganos que utilizan en su construcción colágena son, como indicábamos con anterioridad, semejantes a los nuestros (Minami et al., 1993); (Schneider et al., 1999); (Germain et al., 2000); (Reichl et al., 2004); (Alaminos et al., 2006)

Cuando utilizamos fibrina como sustituto estromal, las propiedades mecánicas no son comparables con la consistencia y elasticidad propias de la mucosa oral, lo que a nuestro juicio dificultaría su empleo con fines terapéuticos. Hay que señalar sin embargo que el estroma constituido a partir de fibrina facilita el crecimiento de los fibroblastos y apenas presenta contracción en su volumen final. Cuando utilizamos agarosa como sustituto estromal, pudimos comprobar al igual que hizo Alaminos en cornea (Alaminos et al., 2006) que los fibroblastos crecen en su interior con mucha dificultad por lo que dicho sustituto estromal fue desechado para su utilización en la construcción de mucosa oral artificial. Con la intención de mejorar las propiedades

mecánicas de la mucosa oral artificial, el cuarto sustituto que elaboramos estuvo compuesto por una mezcla de fibrina y de agarosa al 0.1%. Dicho sustituto demostró un mejor índice de consistencia que cuando sólo se emplea fibrina y una menor contracción que la observada en el resto de los constructos, especialmente en comparación con el sustituto de colágena. La utilización de fibrina tiene una ventaja adicional y es que al proceder del plasma sanguíneo incorpora citoquinas y factores de crecimiento que facilitan la generación de un excelente micromedioambiente que potencia la proliferación y desarrollo de las células a utilizar en el constructo. El soporte fibrina-agarosa permite, como comprobaremos más adelante, que sobre éste se desarrolle un epitelio bien caracterizado siguiendo criterios estrictamente histológicos, al igual que ocurre cuando se utiliza este soporte en la construcción de corneas artificiales (Alaminos et al., 2006); (Muñoz Ávila, 2006)

Para la construcción de la mucosa oral artificial utilizamos en nuestra Tesis una técnica de cultivo secuencial sobre membrana porosa disponible comercialmente (Reichl and Muller-Goymann, 2003).

Este sistema se utilizó por un doble motivo. En primer lugar porque la membrana porosa permite el paso de nutrientes desde el medio de cultivo al tejido en construcción. En segundo lugar porque el diseño de este dispositivo permite utilizar una técnica de cultivo aire-líquido que estimula la estratificación del epitelio localizado sobre el sustituto estromal. La utilización de dispositivos con membranas porosas de distintas variedades han sido utilizados por diferentes autores en protocolos de Ingeniería Tisular para la construcción de diversos tejidos (Richard et al., 1991); (Geroski y Hadley, 1992); (Casasco et al., 2001); (Limat et al., 2003); (Izumi et al., 2003); (Reichl et al., 2004)

Una vez determinada la viabilidad de las células a utilizar y seleccionado el sustrato estromal más apropiado es importante considerar la evaluación y la calidad histológica del tejido artificial formado. Para alcanzar dicho objetivo estudiamos nuestro material con microscopía óptica y con microscopía electrónica de transmisión y de barrido. Es precisamente el estudio microscópico, el que con mayor claridad nos va a determinar la naturaleza estructural del tejido neoforado. Nuestros resultados revelan que aunque con microscopía óptica y con microscopía electrónica de transmisión es posible observar en la primera semana un recubrimiento de la superficie del sustituto estromal, la microscopía electrónica de barrido pone de relieve que dicho recubrimiento es incompleto y que este sólo se produce a partir de la segunda semana. Los datos microscópicos ponen asimismo de relieve que las células durante las dos primeras semanas presentan un alto grado de indiferenciación puesto que tanto con microscopía electrónica de transmisión como con microscopía electrónica de

barrido no ofrecen características microscópicas de diferenciación queratinocítica en el caso del epitelio ni de síntesis de colágena, al menos de manera significativa, en el caso de los fibroblastos. La existencia de microvellosidades y de un patrón superficial tipo I ha sido relacionado en los queratinocitos de la mucosa oral con un bajo grado de diferenciación (Moreu et al., 1993); (Sánchez-Quevedo et al., 1994); (Dourov, 1984); (Kullaa-Mikkonen, 1986, 1987)

Los clásicos trabajos de Hodgkin (Hodgkin et al., 1978) y de Southgate (Southgate et al., 1987) demostraron respectivamente con microscopía electrónica de barrido que las células de los estratos más inferiores de los epitelios estratificados y que los queratinocitos en cultivos primarios, presentaban microvilis en su superficie, esto es, un patrón tipo I como el que presentan las células que recubren nuestros constructos durante la primera semana. En el transcurso de la segunda y tercera semana se desarrolla el proceso de estratificación en el epitelio, comprobándose el progresivo incremento y maduración de los sistemas de unión y de las interdigitaciones que resultan ser semejantes a los de la mucosa oral ortotípica. Dichos sistemas de unión son fundamentalmente de tipo adherente, especialmente máculas adherentes o desmosomas. El número de estratos no alcanza, sin embargo, en la tercera semana el número de hileras existente en la mucosa oral ortotípica del adulto, aunque el sistema de cohesión estructural sí está bien definido. La maduración queratinocítica progresa asimismo de manera temporal y aparte de la morfología y estructura celular, las células presentan patrones superficiales tipo II y III, esto es patrones de superficie con microplicas que se corresponden con estratos más avanzados en el proceso de queratinización (Moreu et al., 1993); (Sánchez-Quevedo et al., 1994); (Dourov, 1984); (Kullaa-Mikkonen, 1986, 1987); (González Jaranay et al., 1990)

En el estroma se evidencia la actividad sintética de los fibroblastos a medida que progresa el desarrollo del constructo. Igualmente las interrelaciones epitelio-estroma se van configurando a través de la membrana basal que ya en la tercera semana ofrece algunas fibras de anclaje aunque no presenta todavía la configuración estructural completa de la membrana basal ortotípica de la mucosa oral. (Ferraris y Campos, 2002)

El resultado final del modelo tras la evaluación microscópica permite comprobar que la utilización de queratinocitos y fibroblastos obtenidos a partir de biopsias, de acuerdo con el protocolo descrito e el apartado correspondiente, y la utilización de un sustituto estromal de fibrina y agarosa facilita el desarrollo de una mucosa artificial constituida por un epitelio con un alto grado de diferenciación y por un estroma estructuralmente apto para satisfacer las propiedades mecánicas básicas que caracterizan a la mucosa oral.

## **CONCLUSIONES**

1. El estudio con microscopía analítica por energía dispersiva de rayos X, pone de relieve que los queratinocitos y fibroblastos aislados de biopsias de mucosa oral y expandidos en cultivos primarios poseen un alto grado de viabilidad al presentar concentraciones intracelulares elevadas de potasio y cloro y un alto índice potasio/sodio. El método de aislamiento y expansión utilizado para los queratinocitos y fibroblastos procedentes de biopsias constituye por tanto un modelo idóneo para la obtención de células viables destinadas a la construcción mediante Ingeniería Tisular de equivalentes de mucosa oral de espesor completo.
2. La elaboración de sustitutos estromales formados por la unión de fibroblastos y cuatro tipos distintos de geles –agarosa, fibrina, colágena y el complejo fibrina-agarosa- pone de relieve que el sustituto estromal más idóneo para la construcción de mucosa oral artificial por Ingeniería Tisular es el conjunto formado por fibroblastos y el complejo fibrina-agarosa. La consistencia, la ausencia de contracción del sustituto, así como la elevada supervivencia de los fibroblastos en el seno del mismo, lo convierten en el sustituto estromal de elección para la construcción mediante Ingeniería Tisular de equivalentes de mucosa oral de espesor completo.
3. La utilización de la técnica de cultivo secuencial sobre soportes porosos pone de relieve que la asociación de una población queratinocítica con un gel de fibrina-agarosa y fibroblastos da lugar a un equivalente de mucosa oral artificial de espesor completo sin que se generen artefactos estructurales significativos ni en la cohesión intertisular ni en lo que a la proliferación y supervivencia celular se refiere.

4. La evaluación del equivalente de mucosa oral artificial generado de acuerdo con la metodología descrita en la presente Tesis Doctoral pone de relieve, con microscopía óptica y electrónica de transmisión y de barrido, que las estructuras generadas alcanzan, tres semanas después de su elaboración, un alto grado de diferenciación tisular, configurando un equivalente de mucosa oral de espesor completo compatible con una mucosa oral de carácter ortotípico. Dicha diferenciación se caracteriza a nivel epitelial por una progresiva estratificación y por el desarrollo de un sistema de cohesión intercelular fundamentalmente de tipo adherente. A nivel del estroma la diferenciación se caracteriza por la síntesis progresiva de colágena en el seno del gel de fibrina y agarosa. La interrelación entre ambas poblaciones queda establecida mediante el desarrollo progresivo de una membrana basal.
  
5. El equivalente de mucosa oral artificial de espesor completo generado mediante Ingeniería Tisular de acuerdo con la metodología descrita en la presente Tesis Doctoral constituye un modelo integrado de epitelio y corion susceptible de ser utilizado en protocolos clínicos de experimentación animal así como en ensayos farmacológicos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abraham E.H., Breslow J.L., Epstein J., Chang-Sing P. and Lechene C. Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport. *Am. J. Physiol.* 1985; 248: 154-164.

Alaminos M. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis". *J. Cell. Physiol.* 2006p; En prensa.

Alaminos M, Sánchez Quevedo MC, Muñoz Ávila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006; 47:3311-17.

Ali F, Halim AS, Najihah SZ, Ibrahim M, Abdullah J. Combination of vascularized outer-table calvarial bone graft based on the superficial temporal vessels and allomatrix for the repair of an orbital-frontal blow out fracture in a child. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2005 33(5): 326-330

Alkan A, Dolanmaz D, Uzun E, Erdem E. The reconstruction of oral defects with buccal fat pad. *Swiss Med. Wkly.* 2003; 133(33-34):465-70.

Álvarez G, Escamilla J, Carranza A. The split sternocleidomastoid myocutaneous flap. *Br. J. Plast. Surg.* 1983; 36:183-186.

Anastassov GE, Schwartz S, Rodríguez E. Buccinator myomucosal island flap for postablative maxillofacial reconstructions: a report of four cases. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2002; 60:816-821.

Antonyshyn O, Gruss JS, Birt BD. Versatility of temporal muscle and fascial flaps. *Br. J. Plast. Surg.* 1988; 41:118.

Arrebola F, Zabiti S, Cañizares FJ, Cubero MA, Crespo PV, Fernández-Segura E. Changes in intracellular sodium, chlorine, and potassium concentrations in staurosporine-induced apoptosis. *J. Cell Physiol.* 2005; 204:500-07.

Arvidson K, Grafstrom RC, Perner A. Scanning electron microscopy of oral mucosa in vivo and in vitro: a review. *Scanning Microsc.* 1988; 2(1):385-96.

Ariyan S. One stage repair of a cervical esophagostoma with two myocutaneous flaps from the neck and shoulder. *Plast Reconstr Surg* 1979; 63: 426-429.

Ariyan S, Cuono C. Use of the pectoralis major myocutaneous flap for reconstruction of large cervical facial or cranial defects. *Am. J. Surg.* 1980; 140:503

Aumailley M, Krieg T. Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. *J. Invest. Dermatol.* 1996;106(2):209-214.

Aviv J, Urken ML. The combined latissimus Dorsi-scapular free flap in head and neck reconstruction. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1991; 117:1242-50.

Bach AD, Bannasch H, Galla TJ, Bittner KM, Stark GB. Fibrin glue as matrix from cultured autologous urothelial cells in urethral reconstruction. *Tissue Eng.* 2001; 7:45-53.

Baek S, Lawson W, Biller H. An analysis of 133 pectoralis major myocutaneous flaps. *Plast. Reconstr. Surg.* 1982; 69: 460.

- Bakamjian V. A technique for primary reconstruction of the palate after radical maxillectomy for cancer. *Plast. Reconstr. Surg.* 1963; 31:103-117.
- Bakamjian V, Souther S. Use of the temporal muscle flap for reconstruction after orbito-maxillary resections for cancer. *Plast. Reconstr. Surg.* 1975; 56:171.
- Bannasch H, Stem-Straeter J, Beier JP. Skin Tissue Engineering. *Clin. Plast. Surg.* 2005; 30:573-79.
- Barbiero G, Duranti F, Bonelli G, Amenta JS, Baccino FM. Intracellular ionic variations in the apoptotic death of L cells by inhibitors of cell cycle progression. *Exp. Cell Res.* 1995; 217:410-18.
- Barnes D, Ossoff R, Pecaro B, Sission G. Immediate reconstruction of mandibular defects with a composite sternocleidomastoid musculoclavicular graft. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1981; 107: 711-714.
- Batchelor A, Tully L. A multiple territory free tissue transfer for reconstruction of a large scalp defect. *Br. J. Plast. Surg.* 1984; 37:76.
- Biller HF, Krespi Y, Lawson W, Baek S. A one stage flap reconstruction following resection for stomal recurrence. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1980; 88:357.
- Boekestein A, Stols AL, Stadhouders AM. Quantitation in x ray microanalysis of biological bulk specimens. *Scan. Electron Microsc.* 1980; (Pt 2):321-34.
- Boekestein A, Thiel F, Stols ALH, Bouw E, Stadhouders A. Surfaces roughness and the use of peak to background in the X-ray microanalysis of bulk bio-organic sample. *J. Microsc.* 1984; 134:327-34.
- Bugis S, Young J, Archival S. Sternocleidomastoid flap following parotidectomy. *Head Neck* 1990; 12:430-435.
- Butler CE. Skin grafts used in combination with free flaps for intraoral oncological reconstruction. *Ann Plast Surg* 2001;47(3):293-98.
- Campos A, Fernandez-Segura E, Garcia-Lopez JM. A cytochemical scanning electron microscopy study of non-specific acid esterase and acid phosphatase activities in human peripheral blood lymphocytes. *Scanning Microsc.* 1991; 5(1):175-81.
- Campos, A. *Cuerpo, histología y medicina. De la descripción microscópica a la Ingeniería Tisular. Discurso de ingreso. Real Academia Nacional de Medicina. Madrid. 2004.*
- Casasco A, Casasco M, Zerbinati N, Icaro Cornaglia A, Calligaro A. Cell proliferation and differentiation in a model of human skin equivalent. *Anat. Rec.* 2001; 264:261-72.
- Caubet Biayna J, Iriarte Ortabe J, Lasa Menéndez V, Pueyo J. Buccinator flap for closure of large palatal defects. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1996; 81:507-508.
- Chen J, Wargner MC. Altered membrane-cytoskeleton linkage and membrane blebbing in energy-depleted renal proximal tubular cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001; 280:619-27.

Cheney ML. Regional Flaps. Temporalis. En: Urken M, Cheney M, Sullivan MJ, Biller H, eds. Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. New York 1995. Raven Press. p. 65-76.

Cheney ML, Urken ML. Regional Flaps. Masseter. En: Urken M, Cheney M, Sullivan MJ, Biller H, eds. Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. New York 1995. Raven Press. p. 77-84.

Chien CY, Hwang CF, Chuang HC, Jeng SF, Su CY. Comparison of radial forearm free flap, pedicled buccal fat pad flap and split-thickness skin graft in reconstruction of buccal mucosa defect. *Oral Oncol.* 2005; 41(7):694-97.

Chinnathambi S, Tomanek-Chalkley A, Ludwig N, King E, DeWaard R, Johnson G, Wertz PW, Bickenbach JR. Recapitulation of oral mucosal tissues in long-term organotypic culture. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 2003; 270:162-74.

Clark R, Singer AJ. Wound repair: basic biology to Tissue Engineering. En: Lanza RP, Langer R, Vacanti J. Principles of Tissue Engineering 2nd Ed. USA. Elsevier. California 2000. p. 857-78.

Clark, R. Wound repair: Overview and general considerations. En: The molecular and cellular biology of wound repair. (RAF Clark, ed.), 3-50. Plenum. New York. 1996a.

Clark, R. The molecular and cellular biology of wound repair. (RAF Clark, ed.), Plenum. New York. 1996b.

Clark JM, Saffold SH, Israel JM. Decellularized dermal grafting in cleft palate repair. *Arch. Facial. Plast. Surg.* 2003; 5(1):40-4.

Clevens RA, Baker SR. Conceptual considerations in head and neck reconstruction. Defect analysis and options for reconstruction. *Otolaryngol. Clin. North. Am.* 1997;30(4):495-517.

Cole P, Horn TW, Thaller S. The Use of Decellularized Dermal Grafting (AlloDerm) in Persistent Oro-nasal Fistulas after Tertiary Cleft Palate Repair. *J. Craniofac. Surg.* 2006; 17(4):636-641.

Colella G, Tartaro G, Guidice A. The buccal fat pad in oral reconstruction. *Br. J. Plast. Surg.* 2004; 57(4):326-29.

Conley J. Use of composite flaps containing bone for major repairs in the head and neck. *Plast. Reconstr. Surg.* 1972; 49:522-526.

Conley J, Gullane PJ: The masseter muscle flap. *Laryngoscope* 1978; 88:605-612.

Conley J, Sachs M, Parke R. The new tongue. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1982; 90:58

Conway H. Muscle plastic operations for facial paralysis. *Ann. Surg.* 1958; 147:541.

Crespo PV, Lopez-Escamez JA, Canizares FJ, Campos A. X-ray microanalytical determination of P, S and K concentrations in the gelatinous membrane of the utricle. *Acta Otolaryngol.* 1993;113(2):176-80.

- Cuono C, Ariyan S. Immediate reconstruction of a composite mandibular defect with a regional osteomusculocutaneous flap. *Plast. Reconstr. Surg.* 1980; 65:477
- Dantzer E, Braye FM. Reconstructive surgery using an artificial dermis (Integra): results with 39 grafts. *Br. J. Plast. Surg.* 2001; 54(8):659-64.
- De Diego E, Villanueva A, Roca A, Martín B, Meana A, Llamas S, Gómez J. Estudio experimental sobre la viabilidad del injerto libre de epitelio urinario autólogo cultivado in vitro. *Actas Urol. Esp.* 2004; 28:714-731.
- Dennis J, Kashima H. Introduction of the Janus flap. A modified pectoralis major myocutaneous flap for cervical esophageal and pharyngeal reconstruction. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1981; 197:431
- Dingman RO, Grabb WC, O'Neal RM, Ponitz RJ. Sternocleidomastoid muscle transplant to masseter area: case of congenital absence of muscles of mastication. *Plast. Reconstr. Surg.* 1969; 43:5-12.
- Dourov N. Scanning electron microscopy contribution in oral pathology. *Scan. Electron Microsc.* 1984; 1:243-48.
- Eckardt A, Fokas K. Microsurgical reconstruction in the head and neck region: an 18 year experience with 500 consecutives cases. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2003;31:197-201.
- Edgerton MT, Tuerk DB, Fisher JC. Surgical treatment of Moebius syndrome by platysma and temporalis muscle transfers. *Plast. Reconstr. Surg.* 1975; 55:305.
- Eversole LR. The histochemistry of mucosubstances in human minor salivary glands. *Arch. Oral. Biol.* 1972; 17(8):1225-39.
- Fabian R. Pectoralis major myocutaneous flap reconstrucion of the laryngopharynx and cervical esophagus. *Laryngoscope* 1988; 98:1227.
- Fan L, Chen G, Zhao S, Hu J. Clinical application and histological observation of pedicled buccal fat pad grafting. *Chin. Med. J.* 2002; 115(10):1556-59.
- Fernández-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A. Electron probe X-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell. Biol. Int.* 1997a; 21:665-669.
- Fernandez-Segura E, Canizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A. Backscattered electron imaging of cultured cells: application to electron probe X-ray microanalysis using a scanning electron microscope. *J. Microsc.* 1997b; 188:72-8.
- Fernández-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp. Cell. Res.* 1999; 253:454-462.
- Ferraris ME, Schneider G. Fluorescent microscopy in the identification of gingival mast-cells. *Rev. Fac. Odontol. Univ. Nac. (Cordoba).* 1977; 9(1):15-21.
- Ferraris ME, Campos A. *Histología y embriología bucodental.* Ed. Panamericana. Madrid 2002.

- Fisher C, Byers MR, Iadarola MJ, Powers EA. Patterns of epithelial expression of Fos protein suggest important role in the transition from viable to cornified cell during keratinization. *Development*. 1991;111(2):253-8.
- Fleischer A, Khafif R. Reconstruction of the mediastinal trachea with a tubed pectoralis myocutaneous flap. *Plast. Reconstr. Surg.* 1989; 84:342.
- Flug M, Kopf-Maier P. The basement membrane and its involvement in carcinoma cell invasion. *Acta Anat. (Basel)*. 1995; 152(2):69-84.
- Friedman M, Grybaieskas V, Skolnik E, Toriumi D, Chilis T. Sternomastoid myoperiosteal flap for reconstruction of the subglottic larynx. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1987; 96:163-169.
- Fuchs, JR, Nasser, BA, Vacanti, JP. Tissue Engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann. Thorac. Surg.* 2001; 72:577-591.
- García Arana L, González J. Injertos y colgajos pediculados. En: Martín-Granizo, et al. *Cirugía Oral y Maxilofacial*. Madrid. ENE Ed. 2004. p.1167-1201.
- Garfein E, Orgill D, Pribaz J. Clinical applications of tissue engineered constructs. *Clin. Plast. Surg.* 2003; 30(4):485-98.
- Germain L, Carrier P, Auger FA, Salesse C, Guerin SL. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Prog. Retin. Eye. Res.* 2000; 19:497-527.
- Geroski DH, Hadley A. Characterization of corneal endothelium cell cultured on microporous membrane filters. *Curr. Eye Res.* 1992; 11:61-72.
- Gilbert A. Vascularized transfer of fibula shaft. *Int. J. Microsurg.* 1979;1:100.
- Gillies HD. Experience with fascia lata grafts in the operative treatment of facial paralysis. *Proc. R. Soc. Med.* 1934; 27:1372.
- Golovine SS: Procède de cloture plastique de l'orbite apres l'exanteration. *J. Fr. Ophthalmol.* 1898; 18:679.
- González García R, Naval L, Rodríguez FJ, Escorial V, Martos PL. Colgajo miomucoso buccinador en la reconstrucción de defectos del área maxilofacial. *Rev. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.* 2005;27(4):197-205.
- González-Jaranay M, Fernández-Segura E, Moreu G, Campos A. Gingival epithelium overgrowth in renal transplant. *Electron Microsc.* 1990; 3:336-37.
- Green M, Gibson J, Bryson J, Thomson E. A one-stage correction of mandibular defects using a split sternum pectoralis major osteomusculocutaneous transfer. *Br. J. Plast. Surg.* 1981; 34:11
- Gullane P, Arena S. Palatal island flap for reconstruction of oral defects. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1977; 103:598.
- Gullane P, Arena S: Extended palatal island mucoperiosteal flap. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1985; 111:330.

- Hall TA, Anderson HC, Appleton TC. The use of thin specimens for X-ray microanalysis in biology. *J. Microsc.* 1973; 99:177-82.
- Hall TA, Gupta BL. .Quantification for the x-ray microanalysis of cryosections. *J. Microsc.* 1982; 126(Pt 3):333-45.
- Hallock GG. Reconstruction of a lower eyelid defect using the temporalis muscle. *Ann. Plast. Surg.* 1984; 13:157.
- Hamacher E: Sternocleidomastoid muscle transplants. *Plast Reconstr Surg* 1969; 1:1-4.
- Harii K, Ono I, Ebihara S. Closure of total cheek defects with two combined myocutaneous free flaps. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1982;108:303.
- Hernández Alfaro F. Injertos óseos en implantología. Técnicas y aplicaciones clínicas. Editorial Quintessence. Barcelona, 2006.
- Hidalgo D. Fibula free flap: a new method of mandible reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.* 1989; 84:71.
- Hill H, Brown R. The sternocleidomastoid flap to restore facial contour in mandibular reconstruction. *Br. J. Plast. Surg.* 1978; 31:143-146.
- Holbrook KA. The keratinocyte handbook. Leigh IM, Lane EB, Watt FM (eds). Cambridge. Cambridge University Press. 1994.
- Hollinshead WH. Textbook of anatomy. 3<sup>a</sup> ed. Hagerstown, MD: Harper and Row; 1974.
- Hughes FM, Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA. Intracellular K<sup>+</sup> suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol. Chem.* 1997; 272:30567-76.
- Iida T, Takami Y, Yamaguchi R, Shimazaki S, Harii K. Development of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent base on a acellular allogenic dermal matrix: a preliminary report of clinical application to burn wounds. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 2005; 39(3):138-46.
- Isenberg BC, Willians C, Tranquillo RT. Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents. *Ann. Biomed. Eng.* 2006; 34:971-85.
- Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE. Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J. Dent. Res.* 2000; 79(3):798-805.
- Izumi K, Feinberg SE, Iida A, Yoshizawa M. Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2003; 32(2):188-97
- Izumi K, Song J, Feinberg SE. Development of a tissue-engineered human oral mucosa: from the bench to the bed side. *Cells Tissues Organs* 2004; 176(1-3):134-52.
- Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* 1992; 120:577-585.

- Kaplan EN. Soft palate repair by elevator muscle reconstruction and a buccal mucosal flap. *Plast. Reconstr. Surg.* 1975; 56:129.
- Kessler P. Harvesting of bone from the iliac crest. Comparison of the anterior and posterior sites. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005; 43(1):51-6.
- Kiener AC, Zelenka I; Gstoettner W. The sternocleidomastoid flap, its indications and limitations. *Laryngoscope* 2001; 111:2201-4.
- Komisar A, Lawson W. A compendium of intraoral flaps. *Head Neck* 1985; 8:91.
- Kornblut A, Westphal P, Michlke A. The effectiveness of a sternomastoid muscle flap in preventing post-parotidectomy occurrence of the Frey syndrome. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 1974; 77:368-373.
- Kornblut A, Westphal P, Michlke A. A re-evaluation of the Frey syndrome following parotid surgery. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1977; 103:258-261.
- Kullaa-Mikkonen A. Scanning electron microscopy study of surface of human oral mucosa. *Scand. J. Dent. Res.* 1986; 94:50-6.
- Kullaa-Mikkonen A. Scanning electron microscopy in oral mucosal research: a review. *Scanning Microsc* 1987; 1: 1145-55.
- Langer R, Vacanti JP. *Tissue Engineering.* Science 1993; 260(5110):920-6.
- Lauer G, Schimming R, Gellrich N, Schmelzeisen R. Prelaminating the fascial radial forearm flap by using tissue-engineered mucosa: improvement of donor and recipient sites. *Plast. Reconstr. Surg.* 2001; 108(6):1564-72.
- Lauer G, Schimming R. Tissue engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: a clinical and immunohistologic study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2001; 59:169-75.
- Lee DY, Cho KH. The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems. *Arch. Dermatol. Res.* 2005; 296: 296–302.
- Lee K, Lore J. Two modifications of pectoralis major myocutaneous flap (PMMF). *Laryngoscope* 1986; 96:363.
- Limat A, French LE, Blal L, Saurat JH, Hunziker T, Salomon D. Organotypic cultures of autologous hair follicle keratinocytes for the treatment of recurrent leg ulcers. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2003; 48:207-14.
- Littlewood M. Compound skin and sternomastoid flaps for repair in extensive carcinoma of the head and neck. *Plast. Reconstr. Surg.* 1967; 20:403-419.
- López de Atalaya. Utilización de los colgajos microquirúrgicos en Cirugía Maxilofacial. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1996.
- Lopez-Escamez JA, Campos A. Standards for X-ray microanalysis of calcified structures. *Scanning Microsc. Suppl.* 1994; 8:171-85.

Lopez R, Dekeister C, Sleiman Z, Paoli JR. The temporalis muscle flap in reconstruction of intraoral defects: an appraisal of the technique. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2002; 94(1):24-30.

Lyons AJ, James R, Collyer J. Free vascularized iliac crest graft: an audit of 26 consecutive cases. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005;43(3):210-14.

Lysaght MJ, Reyes J. The growth of tissue engineering . *Tissue Eng* 200; 7:485-524.

Llames SG, del Río M, Larcher F, García E, García M, Escámez MJ, Jorcano JL, López E, Holguín P, Meana A. Human plasma as a scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 2004; 77:350-55.

Llames SG, García E, García V, del Río M, Larcher F, Jorcano JL, López E, Holguín P, Miralles F, Otero J, Meana A. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank* 2006; 47-53.

Maeda K, Ojimi H, Utsugi R, Ando SA. T-shaped musculomucosal flap method for cleft palate surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 1987; 79:888.

Mansbridge JN, Knapp AM. Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 1987; 89:253-263.

Matsuba HM, Hakki AR, Little JW, Spear SL. The temporal fossa in head and neck reconstruction: twenty-two flaps of scalp, fascia and full-thickness cranial bone. *Laryngoscope* 1988; 98:444.

May M. Muscle transposition for facial reanimation. *Arch Otolaryngol* 1985; 110:184.

McKenna MJ, Cheney ML, Borodic G, Ojemann RG. Management of facial paralysis after intracranial surgery. *Comtemp. Neurol.* 1991; 13:519.

Meana A, Iglesias J, del Río M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martín C, San Román F, Tevar F. Large surface of cultured human epithelium obtained on a termal matriz based on live fibroblasts containing fibrin gels. *Burns* 1998; 24:621-30.

Millard DR. Wide and/or short cleft palate. *Plast Reconstr Surg* 1962; 29:40.

Millard DR, Seider H. The versatile palatal island flap: its use in soft palate reconstruction and nasopharyngeal and choanal atresia. *Br. J. Plast. Surg.* 1977; 30:300.

Minami Y, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993; 34:2316.

Moreu G, Sánchez-Quevedo MC, López-Escámez JA, González-Jaranay M, Campos A. Cell surface patterns in normal human oral gingival epithelium. A quantitative scanning electron microscopy approach. *Histol. HistoPathol.* 1993; 8:47-50.

Muñoz Ávila JI. Utilidad de la Ingeniería Tisular en el tratamiento de las enfermedades corneales. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2006.

Murdoch AD, Iozzo RV. Perlacan: the multidomain heparan sulphate proteoglycan of basement membrane and extracellular matrix. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 1993; 423(4):237-42.

Navarro-Cuellar C, Cuesta Gil M, López de Atalaya FJ, Ochandiano Caicoya S, Navarro Vila C. Reconstrucción de defectos intraorales con injerto de dermis acelular (Alloderm)®. *Cir. Plast Iberoamer* 2004; 30(2):133-38.

Navarro C, Herencia H. Técnicas Microquirúrgicas. En: Martín-Granizo, et al. *Cirugía Oral y Maxilofacial*. Madrid. ENE Ed. 2004. p.1203-1239.

Navarro FA, Mizuno S, Huertas JC, Glowacki J, Orgill DP. Perfusion of medium improves growth of human oral neomucosal tissue constructs. *Wound Repair Regen*. 2001; 9(6):507-12.

Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 2003; 22:28-34.

O'Brien B. A muscle-skin pedicle for total reconstruction of the lower lip: case report. *Plast. Reconstr. Surg.* 1970; 45:395-399.

Ono I, Gunji H, Tateshita T, Sanbe N. Reconstruction of defects of the entire vermilion with a buccal musculomucosal flap following resection of malignant tumors of the lower lip. *Plast. Reconstr. Surg.* 1997; 100:422.

Ortiz Mendoza CM, García Arenas L. Myocutaneous pectoral flap for reconstruction of head and neck traumatic injuries. *Cir. Cir.* 2003; 71(3): 226

Owens N. A compound neck pedicle designed for the repair of massive facial defects: formation, development and application. *Plast. Reconstr. Surg.* 1955; 15:369-389.

Paolantonio M. Treatment of gingival recessions by combined periodontal regenerative technique, guided tissue regeneration and subpedicle connective tissue graft. A comparative clinical study. *J. Periodontol.* 2002; 73(1):53-62.

Parhisca A, Har-El G, Turk JB, Abramson DL. Temporoparietal osteofascial flap for head and neck reconstruction. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2002; 60(6):619-622

Pascual G, Rodríguez M, Correales C, Turénago F, García-Honduvilla N, Bellón JM, Buján J. New approach to improving endothelial preservation in cryopreserved arterial substitutes. *Cryobiology* 2004; 48:62-71.

Peretti GM, Xu JW, Bonassar LJ, Kirchhoff CH, Yaremchuk MJ, Randolph MA. Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Eng.* 2006; 12:1151-68.

Petruzzelli GJ, Jonson JT, Myers EN, Kline JM. Histomorphometric analysis of intraoral split-thickness skin graft. *Head Neck* 1992; 14(2):119-24.

Pickerel KL, Baker HM, Collins JP. Reconstructive surgery of the chest wall. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1947; 84:465.

Rayner CR, Arscott GD. A new method of resurfacing the lip. *Br. J. Plast. Surg.* 1987; 40:454.

Reese AB, Jones IS. Exenteration of the orbit and repair by transplantation of the temporalis muscle. *Am. J. Ophthalmol.* 1961; 51:217.

Reichl S, Muller-Goymann CC. The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int. J. Pharm.* 2003; 250:191.

Reichl S, Bernarz J, Muller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br. J. Ophthalmol.* 2004; 88:5608.

Renner G, Davis WE, Templer J. Temporalis pericranial muscle flap for reconstruction of the lateral face and head. *Laryngoscope* 1984; 94:1418.

Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 1963; 17:208-12.

Rheinwald J, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975a; 6(3): 331-36.

Rheinwald JG, Green H (1). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975b; 6(3):331-43.

Rheinwald JG, Green H (2). Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell.* 1975c; 6(3):317-30.

Richard NR, Anderson JA, Weiss JL, Binder PS. Air/liquid corneal organ culture: a light microscopic study. *Curr. Eye Res.* 1991; 10:739-49.

Richards M. Free composite reconstruction of a complex craniofacial defect. *Aust. N. Z. J. Surg.* 1987; 57:129.

Riches DWH. Macrophage involvement in wound repair, remodelling and fibrosis. En: *The molecular and cellular biology of wound repair.* (RAF Clark, ed.), 3-50. Plenum. New York. 1996.

Rick R, Dorge A, Bauer R, Gehring K, Tharau K. Quantification of electrolytes in freeze-dried cryosections by electron microprobe analysis. *Scanning Electron Microsc* 1979; II:619-26.

Rodríguez IA. Efectos citotóxicos de los sistemas adhesivos dentales. Estudio microscópico y microanalítico. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2005.

Rodríguez Morata A. Microscopía electrónica analítica de la célula endotelial. Sistematización de los patrones microscópicos y microanalíticos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2005.

Roomans GM. Quantitative X-ray microanalysis of biological specimens. *J. Electron Microsc. Tech.* 1988 May; 9(1):19-43.

Roomans GM. Cryopreparation of tissue for clinical applications of X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* 1991; 5: 95-106.

Roomans GM. Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur. Cerll. Mater.* 2002; 18:1-8.

Rosenthal E, Carroll W, Dobbs M, Scott Magnuson J, Wax M, Peter G. Simplifying head and neck microvascular reconstruction. *Head Neck* 2004; 26(11):930-36.

- Schottstaedl E, Larsen L, Bost F. Complete muscle transposition. *J. Bone Joint Surg.* 1955; 37:897-919.
- Rowse AR, Davies DM. The anatomy of the subscapular-thoracodorsal arterial system: study of 100 cadaver dissections. *Br. J. Plast. Surg.* 1984; 37:574-76.
- Rubin LR, Mishiki Y, Lee G. Anatomy of the nasolabial Fol.: the keystone of the smiling mechanism. *Plast. Reconstr. Surg.* 1989; 83:1.
- Rubin LR. *The paralyzed face.* Mosby Yearbook. St. Louis. 1991.
- Rubin LR. The anatomy of a smile: its importance in the treatment of facial paralysis. *Plast Reconstr Surg* 1974; 53:384.
- Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, Campos A, García JM, González-Jaranay M. Regional differences in cell surface patterns in normal human sulcular epithelium. *Histol. HistoPathol.* 1994; 9:149-53.
- Sanders R, Mayou B. A new vascularized bone graft transferred by microvascular anastomosis as a free flap. *Br. J. Surg.* 1979; 66:787.
- Sasaki C: The esternocleidomastoid myocutaneous flap. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1980; 106:74-76.
- Schneider AI, Maier-Reif K, Graeve T. Constructing an in vitro cornea from cultures of three specific corneal cell types. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 1999; 35:515.
- Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratynocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1999; 112:343-53.
- Schultze-Mosgau S, Lee BK, Ries J, Amann K, Wiltfang J. In vitro cultured autologous pre-confluent oral keratinocytes for experimental fabrication of oral mucosa. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004; 33:476-85.
- Shah JP, Haribhakti V, Loree TR, Sutaria P. Complications of the pectoralis major myocutaneous flap I head and neck reconstruction. *Am. J. Surg.* 1990; 160:352-355.
- Shah JP, Patel SG. Cirugía Reconstructora. En: Shah JP, Patel SG, eds. *Cirugía y Oncología de Cabeza y Cuello 3ª edición.* Madrid: Elsevier España; 2004. p. 589-631.
- Shaw RJ, Sutton AF, Cawood JI, et al. Oral rehabilitation after treatment for head and neck malignancy. *Head Neck* 2005; 27(6):459-70.
- Sheehan JE. The muscle nerve grafts. *Surg. Clin. North. Am.* 1935; 15:471.
- Slater K. Cytotoxicity test for high-throughput drug discovery. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001; 12:70-74.
- Siemssen S, Kirkby B, O'Connor T. Immediate reconstruction of a resected segment of the lower jaw using a compound flap of cavicle and sternomastoid muscle. *Plast. Reconstr. Surg.* 1978; 61: 724-735.

Smolka W, Iizuka T. Surgical reconstruction of maxilla and midface: clinical outcome and factors relating to postoperative complications. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2005; 33(1):1-7.

Song J, Izumi K, Lanigan T, Feinberg SE. Development and characterization of a canine oral mucosa equivalent in a serum-free environment. *J. Biomed. Mater. Rest.* 2004; 71:143-53.

Soutar DS, Schecker LR. The radial forearm flap: a versatile method for intraoral reconstruction. *Br. J. Plast. Surg.* 1983; 36:1-8.

Soutar DS, McGregor IA. The radial forearm flap in intraoral reconstruction: The experience of 60 consecutive cases. *Plast. Reconstr. Surg.* 1986; 78:1-8.

Sperry DG, Wassersug RJ. A proposed function for microridges on epithelial cells. *Anat. Rec.* 1976; 185(2):253-7.

Statham PJ, Pawley JB. A new method of particle X-ray microanalysis on peak to background measurements. *Scanning Electron Microsc.* 1978; 1:469-78.

Stofman GM, Carstens Mh, Berman PD, Arena S, Sotereanos GC. Reconstruction of the floor of the mouth by means of an anteriorly based buccinator myomucosal island flap. *Laryngoscope* 1995; 105:90-96.

Suh JD, et al. Analysis of outcome and complications in 400 cases of microvascular head and neck reconstruction. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2004; 130(8):962-66.

Sullivan MJ. Subscapular system. En: Urken M, Cheney M, Sullivan MJ, Biller H, eds. *Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction.* New York: Raven Press 1995. p. 213-15.

Swartz W, Banis J, Newton D, Ramasastry S, Jones N, Acland R. The osteocutaneous scapular flap for mandibular and maxillary reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.* 1986; 77:530.

Takahashi S, Hashimoto K. Derivation of Langerhans cell granules from cytomembrane. *J. Invest. Dermatol.* 1985; 84(6):469-71.

Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, Deschambeault A, Guerin SL, Auger FA, Bazin R, Germain L. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol. Vis.* 2006; 12:65-75.

Tanaka N, Yamaguchi A, Ogi K, Kohama G. Sternocleidomastoid myocutaneous flap for intraoral reconstruction after resection of oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2003; 61: 1179-83.

Taylor GI, Townsend P, Corlett R. Superiority of the deep circumflex iliac vessels as the supply for free groin flaps: experimental work. *Plast. Reconstr. Surg.* 1979; 64:595-604.

Taylor GI, Millar DH, Ham FJ. The free vascularized bone graft: a clinical extension of microvascular techniques. *Plast. Reconstr. Surg.* 1975; 55:533.

Teoh KH, et al. Implant prosthodontic rehabilitation of fibula free-flap reconstructed mandibles: a Memorial Sloan-Kettering Cancer Center review of prognostic factors and implant outcomes. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2005. 20(5):738-46.

Tessier P, Krastinova D: La transposition du muscle temporal dans l'orbite anophtalme. *Ann. Chir. Plast. Esthet.* 1982; 27:212.

Tiwari R, Show G: Repair of intraoral defects with masseter crossover flap after cancer surgery. *Head Neck* 1988; 10: 530.

Toft K, Keller GS, Blackwell KE. Ectopic hair growth after flap reconstruction of the head and neck. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2000; 2:148-50.

Tovi F, Gittot A. A sternocleidomastoid myoperiosteal flap for the repair of laryngeal and tracheal wall defects. *Head Neck* 1983; 5:447-451.

Urken ML, Weinberg H, Vickery C, Biller HF. The neurofasciocutaneous radial forearm flap in head and neck reconstruction: a preliminary report. *Laryngoscope* 1990;100:161.

Urken M, Cheney M, Sullivan M, Biller H: Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. New York 1995. Raven Press.

Urken ML, Biller HF. Regional Flaps. Pectoralis Mayor. En: Urken M, Cheney M, Sullivan MJ, Biller H, eds. Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. New York 1995a. Raven Press. p. 3-28.

Urken ML, Biller HF. Regional Flaps. Sternocleidomastoid. En: Urken M, Cheney M, Sullivan MJ, Biller H, eds. Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. New York 1995b. Raven Press. p. 49-64.

Urken ML, Biller HF. Regional Flaps. Palatal Island. En: Urken M, Cheney M, Sullivan MJ, Biller H, eds. Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. New York 1995c. Raven Press. p. 109-115.

Urken ML. Free Flaps. Radial Forearm. En: Urken M, Cheney M, Sullivan MJ, Biller H, eds. Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. New York 1995a. Raven Press. p. 149-168.

Urken ML. Free Flaps. Iliac crest osteocutaneous and osteomusculocutaneous. En: Urken M, Cheney M, Sullivan MJ, Biller H, eds. Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. New York 1995b. Raven Press. p. 261-90.

Urken ML, Sullivan MJ. Free Flaps. Fibular Osteocutaneous. En: Urken M, Cheney M, Sullivan MJ, Biller H, eds. Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. New York 1995. Raven Press. p. 291-306.

Urken ML, Bridger AG, Zur KB, Genden EM. The scapular osteofasciocutaneous flap: a twelve years experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127(7):862-9.

Vartanian JG, Carvalho AL, Carvalho SM, Mizobe L. Pectoralis major and other myofascial/myocutaneous flaps in head and neck cancer reconstruction: Experience with 437 cases at a single institution. *Head Neck* 2004; 26(12):1018-23.

von Euler A, Palsgard E, von Steyern CV, Roomans GM. X-ray microanalysis of epithelial and secretory cells in culture. *Scanning Microsc.* 1993; 7(1):191-201.

Warley A. The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* 1994a; 8:129-37.

Warley A, Cracknell KPB, Cammish HB, Twort CHC, Ward JPT, Hisrt SJ. Preparation of cultured airway smooth muscle for study of intracellular element concentration by X-ray microanalysis: comparison of whole cells with cryosections. *J. Microsc.* 1994b; 175:143-53.

Warley A. X-ray microanalysis for biologist. Portland Press 1997, London, UK.

Warley A, Skepper JN. Long freeze-drying times are not necessary during the preparation of thin sections for X-ray microanalysis. *J. Microsc.* 2000; 198:116-23.

Weaver A, Vandenberg H, Atkinson D, Wallace J. Modified bilobular "gemini" pectoralis major myocutaneous flap. *Am. J. Surg.* 1982; 144:482

Wilson J, Yiacaimitis A, O'Neill T. Some observations on 112 pectoralis mayor myocutaneous flaps. *Am. J. Surg.* 1984; 147:273.

Wroblewski J, Muller RM, Wroblewski R, Roomans GM. Quantitative X-ray microanalysis of semi-thick cryosections. *Histochemistry* 1983; 77(4):447-63.

Wroblewski J, Roomans GM. X-ray microanalysis of single and cultured cells. *Scan. Electron Microsc.* 1984; 4:1875-82.

Wunsch L, Ehlers EM, Russlies M. Matrix testing for urothelial tissue engineering. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 2005; 15:164-69.

Yang G, et al. Forearm free skin flap transplantation. *Natl. Med. J. China* 1981;61:139.

Zierold K, Schäfer D. Preparation of cultured and isolated cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* 1988; 2:1775-90.

## **ANEXOS**

# ANEXO 1

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

La Cirugía Oral se realiza para resolver determinados problemas de la cavidad oral, tales como: extracción de piezas dentarias o restos apicales incluidos, fenestración o tracción de dientes retenidos, plastia de frenillos labiales, extirpación de quistes maxilares y pequeños tumores de los mismos o del resto de la cavidad oral, implantes dentarios y cirugía preprotésica fundamentalmente. La intervención puede realizarse con anestesia general o local (con los riesgos inherentes a ellas), y que los fármacos utilizados pueden producir determinadas alteraciones del nivel de conciencia por lo que no podré realizar determinadas actividades inmediatamente, tales como conducir un vehículo. Todos estos procedimientos suponen un indudable beneficio, sin embargo no están exentos de complicaciones, algunas de ellas inevitables, tales como:

- Alergia al anestésico u otro medicamento utilizado, antes , durante o después de la cirugía.
- Hematoma y edema de la región.
- Hemorragia postoperatoria.
- Dehiscencia de la sutura.
- Daño de dientes adyacentes.
- Hipoestesia o anestesia del nervio dentario inferior, temporal o definitiva.
- Hipoestesia o anestesia del nervio lingual, temporal o definitiva.
- Hipoestesia o anestesia del nervio infraorbitario, temporal o definitiva.
- Infección postoperatoria.
- Osteítis.
- Sinusitis.
- Comunicación oronasal y/o orosinusal.
- Fracturas óseas.
- Rotura de instrumentos.

Recibida la anterior información, considero que he comprendido la naturaleza y propósitos del procedimiento ..... Además, en entrevista personal con el Dr. .... he sido informado/a en términos asequibles, del alcance de dicho tratamiento. En la entrevista he tenido oportunidad de proponer y resolver mis posibles dudas, y de obtener cuanta información complementaria he creído necesaria. Asimismo se me ha expuesto que si durante el acto quirúrgico, el cirujano considera que existe algún material hístico sobrante, con mi consentimiento, el mismo podrá ser utilizado con fines de investigación. Por ello, me considero en condiciones de ponderar debidamente tanto sus posibles riesgos como la utilidad y beneficios que de él puedo obtener.

