



Universidad de Granada
Facultad de Medicina

**EVALUACIÓN DE SUSTITUTOS PALATINOS
NANOESTRUCTURADOS GENERADOS
MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR PARA SU
UTILIZACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LA
FISURA PALATINA**

TESIS DOCTORAL
ESTHER LICERAS LICERAS
2015

EVALUACIÓN DE SUSTITUTOS PALATINOS NANOESTRUCTURADOS GENERADOS MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR PARA SU UTILIZACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LA FISURA PALATINA

**Memoria que presenta la licenciada en Medicina y Cirugía
Esther Liceras Liceras
para aspirar al título de Doctor**

Fdo. Esther Liceras Liceras

VºBº Director de Tesis

VºBº Director de Tesis

**Fdo. Dr. Ricardo Fernández Valadés
Doctor en Medicina y Cirugía
Complejo Hospitalario Universitario de
Granada**

**Fdo. Dr. Alaminos Mingorance
Doctor en Medicina y Cirugía
Doctor en Ciencias Biológicas
Universidad de Granada**

VºBº Director de Tesis

**Fdo. Dra. Ingrid Johanna Garzón Bello
Doctora en Ingeniería Tisular
Universidad de Granada**

**Departamento de Histología
Universidad de Granada
2015**

Editor: Universidad de Granada.Tesis Doctorales
Autora: Esther Licerias Licerias
ISBN: 978-84-9125-468-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/42157>

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por los Proyecto de Investigación “GENERACIÓN DE SUSTITUTOS DE MUCOSA PALATINA Y HUESO NANOESTRUCTURADOS MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR PARA SU APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE FISURADOS PALATINOS (PI 10/02213)” y “GENERACIÓN DE UN CONSTRUCTO COMPLETO DE PALADAR DURO HUMANO PARA SU UTILIZACIÓN CLÍNICA (PI 14/02110)” del fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III.

Parte de los resultados expuestos en esta memoria han sido publicados en el siguiente artículo científico original:

Generation of a bioengineered autologous bone substitute for palate repair: an in vivo study in laboratory animals. Licerias-Licerias E, Garzón I, España-López A, Oliveira AC, García-Gómez M, Martín-Piedra MÁ, Roda O, Alba-Tercedor J, Alaminos M, Fernández-Valadés R. J Tissue Eng Regen Med. 2015 Oct 9. doi: 10.1002/term.2088. [Epub ahead of print]. Factor de Impacto: 4.428; Área: Engineering, Biomedical; Percentil: 6.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer esta Tesis a mis padres, ya que sin sus ánimos y su apoyo a lo largo de mi carrera no lo habría conseguido. También me gustaría agradecerla a mi marido, ya que sólo él comprende los sacrificios que conlleva nuestro trabajo y siempre ha estado a mi lado y ha creído en mí.

A mis Directores de Tesis, en especial al Dr. Ricardo Fernández Valadés, gran cirujano y amigo, que a lo largo de los años nos ha ido inculcando las inquietudes por mejorar día a día y que desde el inicio de esta Tesis se ha volcado con el trabajo, y siempre me ha animado para poder concluirla. Al Dr. Miguel Alaminos Mingorance, gran histólogo y trabajador incansable de este campo, la Ingeniería Tisular. Ya que sin su esfuerzo diario y su compromiso ésto no habría sido posible. Y también a la Dra. Ingrid Garzón Bello, por sus enseñanzas en el laboratorio y su disponibilidad para el trabajo. Y al grupo de trabajo de histología, en especial a Miguel Ángel y Ana Celeste, por su ayuda en el cuidado de los cultivos y los ensayos posteriores.

Al Dr. Antonio España, ortodoncista y amigo, que nos ha ayudado en todas y cada una de las intervenciones llevadas a cabo con nuestros animales, y siempre ha estado dispuesto a darnos soluciones a los problemas.

Y a mis compañeras de residencia, por compartir las intervenciones de nuestros animales, estar siempre voluntarias a ayudarnos en este proyecto, y por soportarme tanto en el camino.

Gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	5
INTRODUCCIÓN.....	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
2. FISURA PALATINA.....	15
A. EMBRIOLOGÍA Y ANATOMÍA DEL PALADAR.....	16
B. ESTRUCTURA HISTOLÓGICA Y FUNCIÓN DEL PALADAR.....	19
C. TRATAMIENTO DE LA FISURA PALATINA.....	28
3. INGENIERÍA TISULAR.....	33
a. CÉLULAS MADRE O TRONCALES.....	34
b. MATRIZ EXTRACELULAR.....	40
c. FACTORES DE CRECIMIENTO.....	42
4. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO.....	43
a. TEJIDO ADIPOSO.....	43
b. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL TEJIDO ADIPOSO.....	46
OBJETIVOS.....	48
MATERIAL Y MÉTODOS.....	50
1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	51
1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	51

1.2 MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS	52
2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	54
2.1 DESARROLLO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS DE MUCOSA ORAL	56
2.2 SUBCULTIVO DE CÉLULAS PROCEDENTES DE CULTIVOS PRIMARIOS DE MUCOSA ORAL y de células madre de tejido adiposo (ADSCs)	58
2.3 ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR EN SUBCULTIVOS SECUENCIALES DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL TEJIDO ADIPOSO	60
3. ELABORACIÓN DE CONSTRUCTOS TISULARES MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR	65
3.1 GENERACIÓN DE SUSTITUTOS DEL CORION DE LA MUCOSA PALATINA	65
3.2 CONSTRUCCIÓN DE SUSTITUTOS COMPLETOS DE MUCOSA PALATINA	67
3.3 GENERACIÓN DE SUSTITUTOS DE HUESO PALATINO MEDIANTE TRANSDIFERENCIACIÓN DE ADSCS	68
3.4 PROCESO FINAL DE LA FORMACIÓN DE LOS CONSTRUCTOS: LA NANOESTRUCTURACIÓN	70
4. GRUPOS DE ESTUDIO PARA EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i>	71
5. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	74
6. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL Y HUESO <i>IN VIVO</i>	75

6.1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO MEDIANTE TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA.....	75
6.2. ANÁLISIS HISTOQUÍMICO.....	76
6.3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO.....	76
6.4. ANÁLISIS CUANTITATIVOS.....	76
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	77
RESULTADOS.....	78
1. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR.....	79
1.1. VIABILIDAD CELULAR DETERMINADA MEDIANTE EL MÉTODO DE AZUL TRIPÁN.....	79
1.2. VIABILIDAD CELULAR DETERMINADA MEDIANTE ENSAYOS MIXTOS METABÓLICOS Y DE EXCLUSIÓN DE COLORANTES VITALES FLUORESCENTES.....	81
2. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL PALADAR DE ANIMALES SOMETIDOS A INJERTO DE SUSTITUTOS PALATINOS.....	84
2.1 ANÁLISIS DE ANIMALES CON INJERTOS DE SUSTITUTOS DE MUCOSA PALATINA (GRUPO I).....	84
2.2. ANÁLISIS DE ANIMALES CON INJERTOS DE SUSTITUTOS DE HUESO PALATINO (GRUPO II).....	86
3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL Y HUESO DEL PALADAR.....	91
3.1. ANÁLISIS DE ANIMALES CON INJERTO DE SUSTITUTOS DE MUCOSA PALATINA (GRUPO I).....	91

3.2 ANÁLISIS DE ANIMALES CON INJERTOS DE SUSTITUTOS DE HUESO PALATINO (GRUPO II)	98
DISCUSIÓN	101
CONCLUSIONES.....	112
BIBLIOGRAFÍA.....	115

INTRODUCCIÓN

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los defectos de la cavidad oral, ya sean de tipo congénito, traumático o tumoral, requieren para su reparación gran variedad de técnicas de complejidad variable. Las más utilizadas son la cicatrización-granulación por segunda intención (*Clark R 2000*), los injertos o colgajos cutáneos de espesor parcial o total (*Petruzzelli GJ 1992; Urken ML 1995; Butler CE 2001*), el implante de materiales biocompatibles (*Paolantonio, Dolci et al. 2002*), el trasplante heterólogo e incluso las técnicas de reconstrucción microquirúrgicas (*Rosenthal, Carroll et al. 2004*). Sin embargo, ningún procedimiento de los mencionados está libre de morbilidad y complicaciones a nivel local y general (*Shah JP 2004*).

En el tratamiento quirúrgico de la fisura palatina se han utilizado, tradicionalmente, colgajos de fibromucosa palatina y mucosa nasal, y a veces, de vómer, que se suturan en línea media para separar la cavidad oral de la nasal, sin interposición de hueso. Típicamente, estos tejidos son obtenidos a partir de la fibromucosa palatina que recubre el hueso palatino remanente lateralmente a la fisura, lo cual obliga a denudar este hueso, con las complicaciones que ello conlleva. Entre otras, la denudación y/o la cicatrización de las zonas donantes de estos tejidos puede generar retracciones que afecten el crecimiento del maxilar, pudiendo llegar a grados importantes de hipoplasia maxilar.

Aunque estas técnicas de estafilorrafia son ampliamente utilizadas, la ausencia de un tejido duro a este nivel puede ser el responsable de los resultados sub-óptimos que encontramos en algunos pacientes. Además, la obtención de colgajos locales no siempre es posible, especialmente en casos con fisuras de gran tamaño y gran separación entre los bordes palatinos, lo cual obliga a buscar fuentes alternativas de tejido para la reparación de la fisura palatina.

En conjunto, las complicaciones de la técnica de estafilorrafia no parecen depender del grosor del colgajo o de las técnicas utilizadas, y hacen necesarias actuaciones posteriores a nivel ortodóncico y ortognático, aumentando así el coste económico, psicológico y social. En ocasiones, especialmente cuando existe afectación a nivel alveolar, se realiza injerto óseo autólogo (cadera, calota, tibia, etc) o de banco, mejorando significativamente los resultados clínicos y funcionales de los pacientes con fisura palatina (*Torikai, Hirakawa et al. 2009; Cho-Lee, Garcia-Diez et al. 2013; Hara, Mitsugi et al. 2013*). Sin embargo, en estos casos pueden aparecer problemas locales en la zona de extracción, tales como dolor, complicaciones infecciosas o de cicatrización. (*Pigott, Albery et al. 2002; Ito, Noguchi et al. 2006; Meara, Livingston et al. 2011*). Para evitar todo ello, se ha recurrido a diversas técnicas para cubrir las zonas cruentas de distintos materiales, tanto de forma experimental como en pacientes, con resultados diversos. (*Fujioka and Fujii 1997; Gupta, Panetta et al. 2009*)

A pesar de la gran variedad de opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de la patología del paladar, existe la necesidad de encontrar sustitutos anatómicos y funcionales similares al tejido a reemplazar. Por ello, los avances actuales en medicina, investigación y biotecnología, han abierto la puerta a la utilización de tejidos elaborados mediante **Ingeniería Tisular**, reduciéndose así la morbilidad surgida en los diversos tratamientos para dicha patología.

En la actualidad, son escasos los laboratorios que trabajan en la fabricación de sustitutos de mucosa palatina y tejido óseo mediante Ingeniería tisular, aunque existen grandes avances en el cultivo y la fabricación de córnea, piel, mucosa oral y cartílago humano (*Moreau, Caccamese et al. 2007; Behnia H 2009*). Algunos investigadores han conseguido cultivar extensiones importantes de tejido humano a partir de pequeñas biopsias de mucosa oral autóloga, exentas de morbilidad asociada, utilizando estos tejidos para la reparación de lesiones de la propia mucosa oral o incluso de órganos distintos como pueden ser la córnea (*Inatomi, Nakamura et al. 2006*) o la uretra (*Lauer, Schimming et al. 2001*). Son limitados los estudios experimentales

relacionados con la generación de mucosa oral en laboratorio para el tratamiento de defectos del paladar son muy escasos, aunque los autores sugieren que estos tejidos podrían mejorar la cicatrización, evitando las retracciones y alteraciones en el crecimiento del maxilar en animales de experimentación (*Fujioka and Fujii 1997; Jansen, Kuijpers-Jagtman et al. 2008; Ophof R 2008*). En la mayoría de estos estudios, los autores refieren dificultades relacionadas con la supervivencia *in vitro* del epitelio de la mucosa oral, cuyo cultivo es muy delicado, y con la supervivencia *in vivo* de los injertos una vez implantados en los animales de experimentación. (*Owens K W 2001; Ophof, Maltha et al. 2004; Ophof R 2008*) Por todo ello, es necesario desarrollar métodos y técnicas que permitan mejorar la supervivencia de las células de la mucosa oral generada en laboratorio a partir de cultivos celulares, así como desarrollar biomateriales plenamente biocompatibles para desarrollar así nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de estos pacientes.

En este contexto, recientes estudios han logrado desarrollar sustitutos viables de hueso mediante ingeniería tisular (*De Scott TG 2013*), incluyendo un modelo de hueso generado por nuestro grupo de investigación a partir de biomateriales de fibrina-agarosa y células madre mesenquimales del tejido adiposo (*Nieto Aguilar R 2011*) Sin embargo, la utilidad *in vivo* de estos sustitutos aún no ha sido determinada en modelos de fisura palatina experimental. Aunque diversos modelos de tejidos han sido elaborados mediante técnicas de bioingeniería, aún es necesario determinar la utilidad de estos modelos para la prevención y/o tratamiento de los efectos secundarios asociados a la estafilorrafia tradicional (*Moreau, Caccamese et al. 2007; Panetta NJ 2008; Behnia H 2009; van Hout WM 2011; Behnia H 2012; Moharamzadeh K 2012; Pradel W 2012; Pourebrahim N 2013*)

En el presente apartado introductorio de esta Tesis Doctoral se realizará, en primer lugar, una puesta al día relacionada con la anatomía y la histología del paladar humano y los tratamientos quirúrgicos más utilizados en la actualidad para la reparación de la fisura palatina. En segundo lugar, se introducirán conceptos fundamentales relacionados con la ingeniería de tejidos y se planteará la utilidad de la ingeniería tisular en este campo, estableciéndose el fundamento necesario para la elaboración de la mucosa oral artificial destinada a una posible aplicación

terapéutica. En posteriores apartados de la presente Tesis Doctoral se plantearán los objetivos relacionados con la elaboración y evaluación de nuevos sustitutos de tejido palatino, se expondrán los principales métodos y técnicas experimentales utilizados para dar respuesta a estos objetivos y se presentarán los principales resultados obtenidos durante la fase experimental, los cuales serán discutidos en el apartado dedicado a la discusión. Finalmente, se elaborarán las conclusiones de la presente Tesis Doctoral para dar respuesta a los objetivos inicialmente planteados.

2. FISURA PALATINA

La **fisura palatina o labiopalatina** es la malformación congénita más frecuente del macizo craneofacial en la infancia, llegando a afectar aproximadamente a 1-2 de cada 1000 recién nacidos vivos (*Figura 1*). Dicha incidencia varía en función del sexo y la raza, predominando el sexo masculino en los casos de asociación de fisura de labio y paladar, y el sexo femenino en los casos de fisura palatina aislada. Existe también heterogeneidad racial en dicha incidencia, siendo en orden descendente mayor en orientales, después en caucásicos y finalmente en la raza negra. No existiendo dicha variación interracial en los casos en los que la anomalía se circunscribe tan sólo al paladar.

Podemos encontrar distintos grados de severidad dentro de los pacientes con dicha malformación, así aproximadamente la mitad presenta una fisura de labio y paladar (46%), un 33% presentan afectación palatina aislada y en un 21% la afectación se encuentra tan sólo en el labio. Clínicamente, puede presentarse de manera aislada (80%), o englobarse dentro de síndromes con otras anomalías sistémicas (20%) (*Tabla 1*). Actualmente, se reconocen más de 300 síndromes en los que se haya incluida esta malformación. (*LaRossa 2000*) Su reparación es quirúrgica y se realiza durante la infancia, siendo llevada a cabo en la actualidad mediante unidades multidisciplinarias.



Figura 1. Fisura Labiopalatina completa

Tabla 1. SINDROMES QUE ASOCIAN ANOMALIAS LABIOPALATINAS

S. de Pierre Robin	S. cromosómicos: S. de Down, S. de
S. de Cornelia de Lange	Turner...
S. de Treacher Collins	S. Fascio-oro-digital
S. de Goldenhar	Enanismo diastrófico
S. de Rubinstein Taybi	Holoprosencefalia
S. de Van der Woude	etc.

A. EMBRIOLOGÍA Y ANATOMÍA DEL PALADAR

Los tejidos faciales, incluidos el labio y el paladar, derivan de células de la cresta neural. La formación de la cara transcurre durante los primeros 3 meses de vida intrauterina y los primeros centros de desarrollo aparecen alrededor de la 3ª semana de gestación. Así, las distintas estructuras de la cara se formarán a partir de 5 primordios embrionarios: la prominencia frontonasal, 2 procesos maxilares y 2 procesos mandibulares (*Figura 2*).

El paladar se forma en 2 fases:

- Paladar primario: de él derivan el labio superior, la columela nasal, el alvéolo maxilar y el paladar óseo anterior hasta el foramen incisivo. Este desarrollo se produce entre la 4ª y la 8ª semana.
- Paladar secundario: del que derivan el paladar óseo posterior hasta el foramen y el paladar blando. Se desarrollan entre la 8ª y al 12ª semana.

La fisura palatina se produce porque existe una falta de acercamiento y fusión entre sí de los procesos palatinos laterales, con el tabique nasal, con el borde posterior del proceso palatino medial, o con ambos. La hendidura puede afectar sólo la úvula, extenderse a través de las

regiones palatinas blanda y dura, y los casos graves se acompañan de labio fisurado (Figura 3).

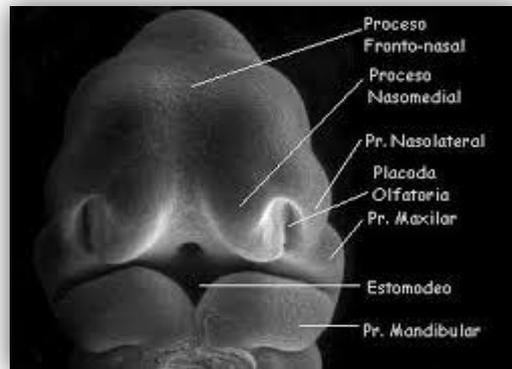


Figura 2. Imagen tridimensional de la formación del macizo facial. Fusión de los procesos nasal y maxilar.

(Sorolla 2010)

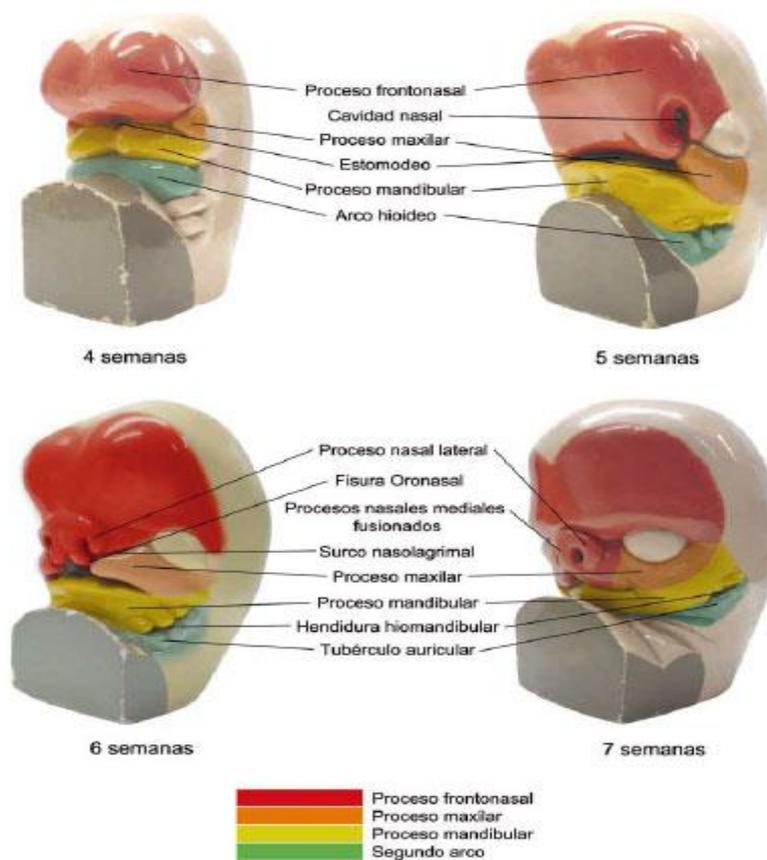


Figura 3. Esquema de formación del macizo facial a partir de los diferentes procesos.

(Meruane M 2012)

En la bóveda palatina se pueden distinguir dos partes: una anterior o paladar duro, y una posterior o paladar blando. En el paladar duro se encuentra el foramen incisivo, por el que pasan el nervio y la arteria esfenopalatina. Bajo su mucosa, a la altura del segundo molar, se encuentra el orificio palatino mayor, de donde emergen los vasos y el nervio palatino mayor. El borde posterior del paladar duro se continúa con el paladar blando, que es un tabique músculo-membranoso que prolonga la bóveda palatina hacia atrás y abajo, y separa la nasofaringe de la orofaringe. El borde posterior del paladar blando presenta en su parte media una prolongación, la úvula, y a cada lado, dos repliegues curvilíneos, los pilares anteriores y posteriores del velo del paladar, que limitan la fosa amigdalina (*Figura 4*).

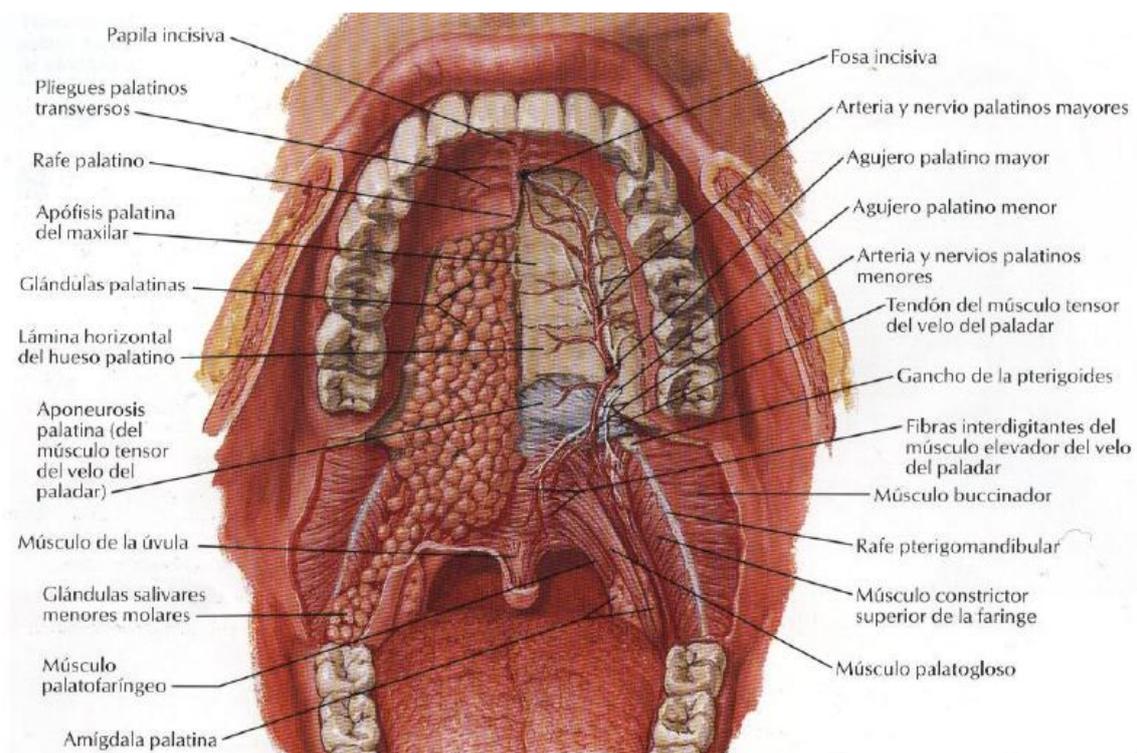


Figura 4. Anatomía del paladar.

(<http://anatomia-es-posible.webnode.es/parte-2-de-la-anatomia-/laminas/croquis-guia/>)

El paladar supone una barrera entre las cavidades oral y nasal. Se encuentra cubierto de mucoperiostio y existe un límite claro entre la mucosa del paladar duro y la de los procesos alveolares. El paladar blando es móvil y funciona como una válvula que separa la nariz de la boca durante la deglución y el lenguaje. Su función depende de los músculos elevadores del velo del paladar, los cuales elevan el paladar blando y lo dirigen hacia la zona más posterior, además de ser responsables del movimiento medial de las paredes laterales de la faringe. El músculo constrictor superior de la faringe y el músculo de la úvula, asisten estos movimientos, incrementando el contacto de la superficie nasal del paladar blando a medida que se dirige hacia la zona posterior. Sin esta acción, el sonido se escapa a través de la nariz y el habla se nasaliza. Esta pronunciación hipernasal es característica de los pacientes con fisura palatina, y a menudo continúa en pacientes que ya han sido sometidos a tratamiento reparador. (Oldham 2005)

B. ESTRUCTURA HISTOLÓGICA Y FUNCIÓN DEL PALADAR

La cavidad oral está tapizada por una membrana mucosa húmeda que forma una barrera estructural entre el cuerpo y el medio externo denominada **mucosa oral**. Esta humedad es aportada por la secreción salivar, que es necesaria para evitar la aparición de alteraciones en su estructura y funcionamiento.

La mucosa oral está integrada por dos capas de tejidos estructural y embriológicamente diferentes:

- Tejido epitelial, de origen ectodérmico.
- Tejido conectivo, de origen mesenquimatoso (también llamado lámina propia, corion o estroma).

Las dos capas están conectadas por una membrana basal, en una relación ondulada. Ésto es debido a que el tejido conectivo emite prolongaciones hacia el epitelio, invaginaciones denominadas papilas coriales, mientras que el epitelio emite proyecciones hacia la lámina propia, evaginaciones que reciben el nombre de crestas epiteliales. Esta disposición en papilas y crestas facilita la nutrición del epitelio avascular a partir del tejido conectivo que es de carácter vascular (*Figura 5*).

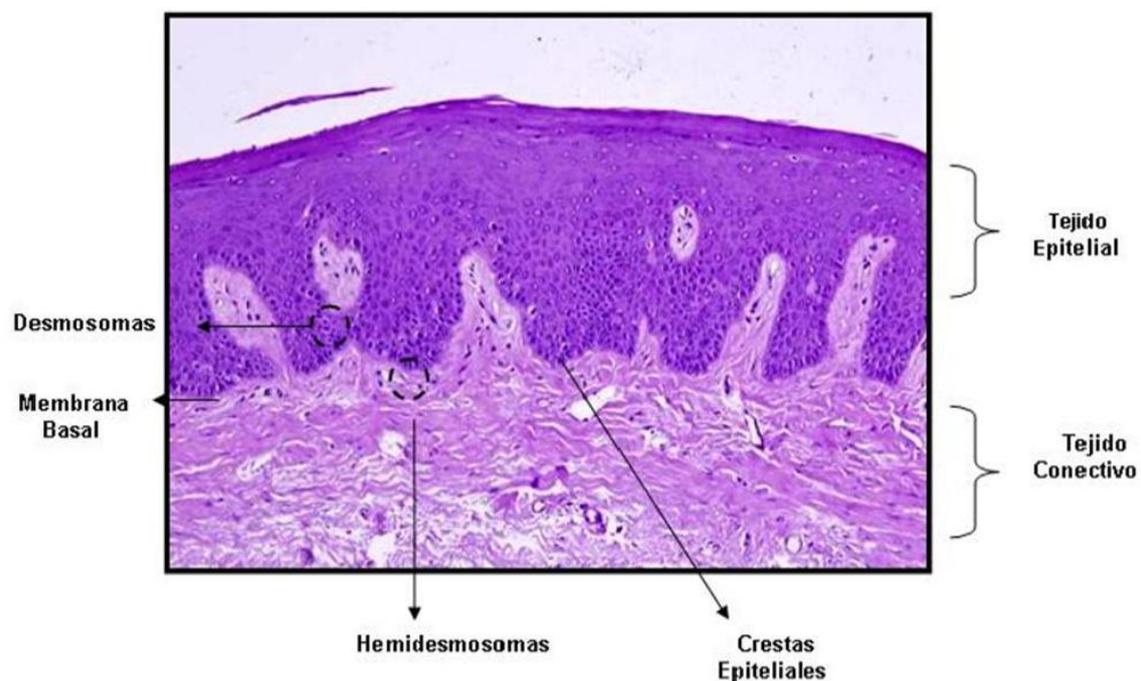


Figura 5. Mucosa Oral Humana (Técnica Hematoxilina-Eosina).

El 90% de la población celular total del epitelio de la mucosa oral lo constituyen los **queratinocitos**. Éstos se distribuyen por estratos dependiendo del estado madurativo en el que se encuentren (basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo), cada uno con unas características determinadas (*Figura 6*). Además, en dicho epitelio también podemos encontrar otras poblaciones celulares tales como melanocitos, células de Merkel, células de Langerhans, y células del sistema linfocitario. (*Ferraris ME 2002*)

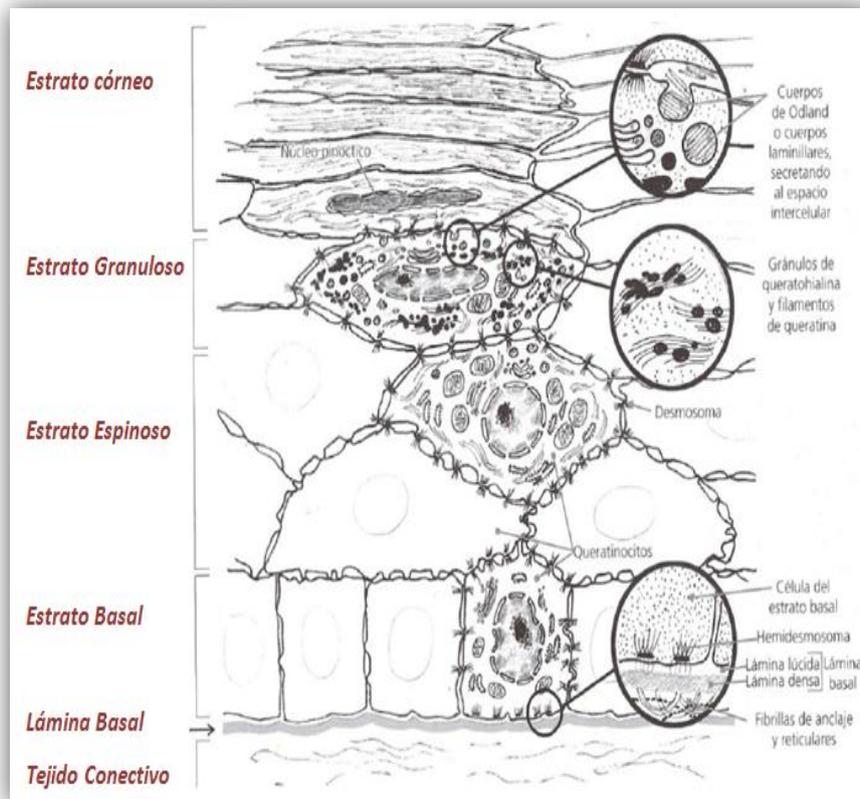


Figura 6. Esquema con la diferenciación celular en un epitelio plano estratificado queratinizado.

(Ferraris ME 2002)

De profundidad a superficie los estratos del epitelio que podemos encontrar son:

- ✓ **Estrato basal o germinativo:** Capa unicelular situada sobre la lámina basal que contiene células madre pequeñas y cúbicas con escaso citoplasma, situándose así los núcleos muy cercanos. Las células madre darán lugar a los queratinocitos maduros que van migrando hacia los estratos más superficiales según van diferenciándose.
- ✓ **Estrato espinoso:** Formado por varias capas celulares. Sus células son de mayor tamaño que las del estrato previo, y con múltiples proyecciones citoplasmáticas o "espinas", de ahí su nombre.

- ✓ Estrato granuloso: Sus células contienen abundantes gránulos de queratohialina de naturaleza basófila en su citoplasma que se tiñen intensamente.

- ✓ Estrato lúcido: Formado por células eosinófilas en avanzado estado de queratinización. A medida que aumenta la queratina en las células, el núcleo y las organelas desaparecen.

- ✓ Estrato córneo: En él se encuentran las células más diferenciadas. Son células cornificadas, con la membrana basal engrosada, con el núcleo y las organelas desintegradas y ocupadas casi en su totalidad por filamentos de queratina.

En profundidad tras el epitelio, encontramos la **membrana basal** que separa el epitelio y el corion. Esta membrana se divide en 2 regiones si la observamos con microscopía electrónica: la lámina basal y la lámina reticular, sintetizada por las células del epitelio o por las del tejido conectivo subyacente respectivamente.

La membrana basal posee varias funciones: es una estructura de fijación entre epitelio y tejido conectivo, es un filtro físico y químico (formado por la malla de colágeno tipo IV), actuando como una barrera defensiva y sirve de guía en el proceso de reepitelización de las heridas.

Tras la membrana basal encontramos la **lámina propia o corion**, que es una lámina de tejido conectivo de espesor variable que confiere sostén y nutrición del epitelio. El tejido conectivo puede ser laxo, denso o semidenso según la región, al igual que la distribución de células, fibras y sustancia fundamental de acuerdo a la región de la cavidad oral que se considere. Entre las células que podemos encontrar en esta capa destacan los fibroblastos. Existe una relación muy estrecha entre el fibroblasto y el queratinocito de la población epitelial superior, ya que la secreción de interleuquina 1 del queratinocito activado promueve a la proliferación y

actividad del fibroblasto, encargado de la secreción de prostaglandinas que estimulan la proliferación y diferenciación de los queratinocitos.

Además, la matriz extracelular de esta zona es muy rica en fibras de colágeno, elásticas y reticulares, y todas ellas evitan la deformación de este epitelio que se encuentra sometido de forma continuada diversas agresiones externas. También a este nivel, existe una rica inervación con terminaciones nerviosas sensoriales que recogen información sobre la percepción de dolor, temperatura, tacto y presión.

Finalmente, en la zona más profunda, encontramos la **submucosa** que está formada por tejido conectivo laxo, y es más gruesa en las zonas sometidas a mayor estrés. En ella podemos encontrar glándulas salivares, vasos, nervios y tejido adiposo.

La mucosa oral no es uniforme, por lo que teniendo en cuenta tanto su estructura como su ubicación, en la cavidad bucal podemos encontrar distintos tipos de mucosa. Así, la mucosa oral puede clasificarse desde un punto de vista histológico o desde un punto de vista topográfico, como mostraremos a continuación.

I. Clasificación Histológica

Desde el punto de vista histológico podemos encontrar tres tipos fundamentales de epitelio dependiendo del grado de queratinización de los queratinocitos (*Figura 7*):

- A. Epitelio plano estratificado ortoqueratinizado
- B. Epitelio plano estratificado paraqueratinizado
- C. Epitelio plano estratificado no queratinizado

A. Epitelio plano estratificado ortoqueratinizado

En este epitelio encontramos todas las capas: basal, espinosa, granulosa y córnea.

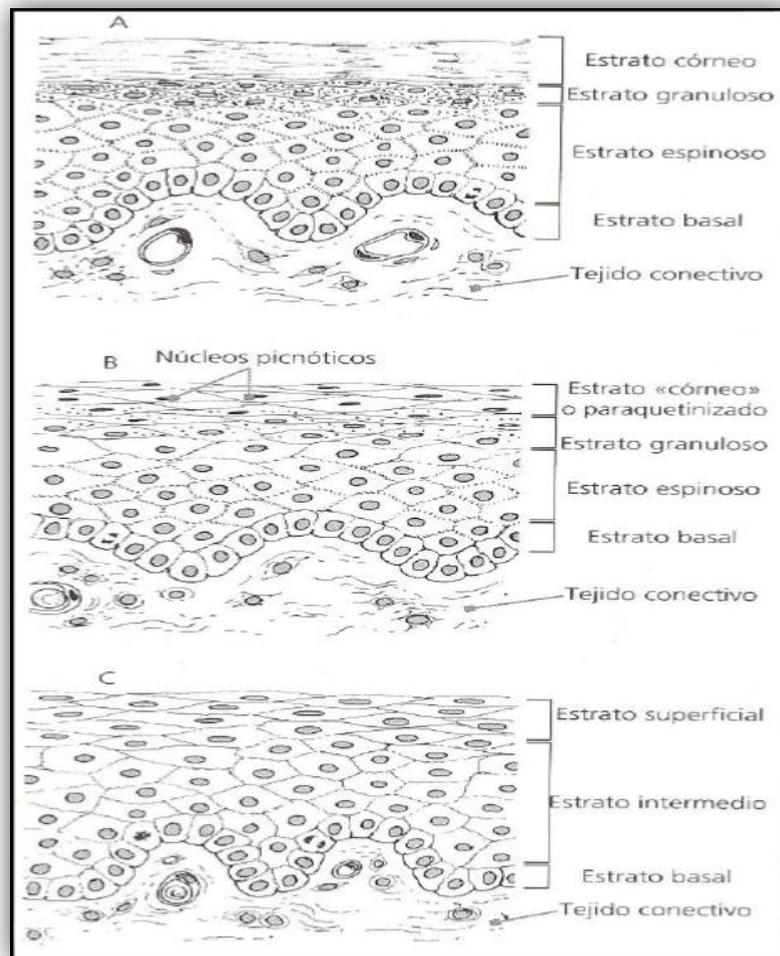


Figura 7. Esquemas con los diferentes tipos de epitelios estratificados planos. **A.** queratinizado. **B.** paraqueratinizados. **C.** no queratinizado. (Ferraris ME 2002)

B. Epitelio plano estratificado paraqueratinizado

Este tipo de epitelio presenta características similares al queratinizado a nivel de los estratos basal, espinoso y granuloso, aunque este último presenta gránulos poco desarrollados. Las diferencias fundamentales están en los elementos celulares del estrato córneo, pues en este tipo de epitelio, las células de este estrato conservan sus núcleos y algunas organelas, lo cual indica un metabolismo celular escaso. El epitelio estratificado paraqueratinizado presenta gran cantidad de tonofilamentos.

C. Epitelio plano estratificado no queratinizado

Se diferencia del epitelio queratinizado principalmente porque no existe una capa córnea superficial, careciendo también de estrato granuloso, aunque se pueden formar gránulos incompletos. Por tanto, podemos encontrar tres capas en el epitelio no queratinizado:

- *capa basal*: Esta capa es similar a la descrita anteriormente.
- *capa intermedia*: Presenta células poliédricas, asociadas mediante desmosomas e interdigitaciones, con núcleo redondo de cromatina laxa y citoplasma basófilo, con abundante cantidad de glucógeno.
- *capa superficial*: Son células aplanadas y nucleadas, de aspecto normal.

II. Clasificación Topográfica

Teniendo en cuenta que la estructura morfológica de la mucosa oral varía por la adaptación funcional en las diferentes regiones de la cavidad oral, podemos clasificarla en tres tipos principales:

- A. Mucosa de revestimiento.
- B. Mucosa masticatoria.
- C. Mucosa especializada.

La **mucosa de revestimiento** cumple función de protección, y está formada por un epitelio plano estratificado no queratinizado, con un tejido conectivo laxo con fibras elásticas y una submucosa bien definida con glándulas salivares menores. Es muy flexible y se adapta a la contracción y la relajación. El número de capas del epitelio es mayor que el de la mucosa masticatoria, siendo escasas las crestas epiteliales y las papilas del tejido conectivo. Este tipo de mucosa es la que encontramos en mejillas, labios, cara inferior del labio, paladar blando, cara ventral de lengua y suelo de la boca.

La **mucosa masticatoria** está sometida a fuerzas intensas de fricción y presión originadas en el impacto masticatorio. Suele estar fijada al hueso y no experimenta estiramiento. Este tipo de mucosa es típico de la encía y el paladar duro. Está formada por un epitelio plano estratificado que puede ser ortoqueratinizado o paraqueratinizado, y una lámina propia gruesa con densos haces de fibras colágenas, careciendo de fibras elásticas, ya que esta mucosa recubre sólo zonas inmóviles. Carece de submucosa en la encía, pero está presente en la parte lateral del paladar duro, donde se encuentra tejido adiposo y glandular.

La **mucosa especializada** podemos encontrarla en la cara dorsal de la lengua, y recibe este nombre porque aloja botones gustativos intraepiteliales.

III. Importancia de las Citoqueratinas en la diferenciación epitelial de la mucosa oral.

El epitelio de la mucosa oral humana cumple sus funciones a través de la expresión de una serie de proteínas especializadas. Entre ellas destacan las **citoqueratinas (Cks)**, proteínas de filamento intermedio, típicas de las células epiteliales que forman una compleja familia de 20 polipéptidos diferentes con un peso molecular aproximado de 40 a 68 kD (*Franke WW 1981; Moll, Franke et al. 1982; Eichner R 1984; Quinlan, Schiller et al. 1985*).

Las citoqueratinas están codificadas por una numerosa lista de genes expresados por los diferentes tipos de epitelio. Como proteínas de filamento intermedio, las citoqueratinas tienen funciones en el epitelio asociadas al citoesqueleto y a las uniones célula-célula. Por lo que, son necesarias para el mantenimiento de la forma celular, integridad, morfología y cohesión entre las células epiteliales. Y por esta razón, se consideran excelentes marcadores de los diferentes patrones de diferenciación epitelial (*Moll, Franke et al. 1982*).

Se han descrito alrededor de 20 citoqueratinas en los distintos tipos de epitelio. Y es la expresión de diferentes grupos de citoqueratinas lo que da especificidad a cada tipo de epitelio (Raul, Sawant et al. 2004). Los epitelios simples están frecuentemente asociados a las proteínas de bajo peso molecular, polipéptidos tipo I, y por otra parte, las proteínas de peso molecular intermedio, citoqueratinas tipo II, se asocian a epitelios estratificados.

Las citoqueratinas que tienden a expresar los distintos tipos de epitelio son:

- ✓ El epitelio simple tiende a expresar Cks 7, 8, 18 y 19.
- ✓ El epitelio estratificado no queratinizado expresa grandes cantidades de Cks 4 y 13 en células de la capa suprabasal (Costea, Loro et al. 2003; Sanchez-Quevedo, Alaminos et al. 2007) y Ck 5 y 14 en las células de la capa basal.
- ✓ El epitelio estratificado queratinizado expresa Ck 1 y 10, las cuales pueden ser utilizadas como marcadores de cornificación (van der Velden, Manni et al. 1999) (Figura 8).

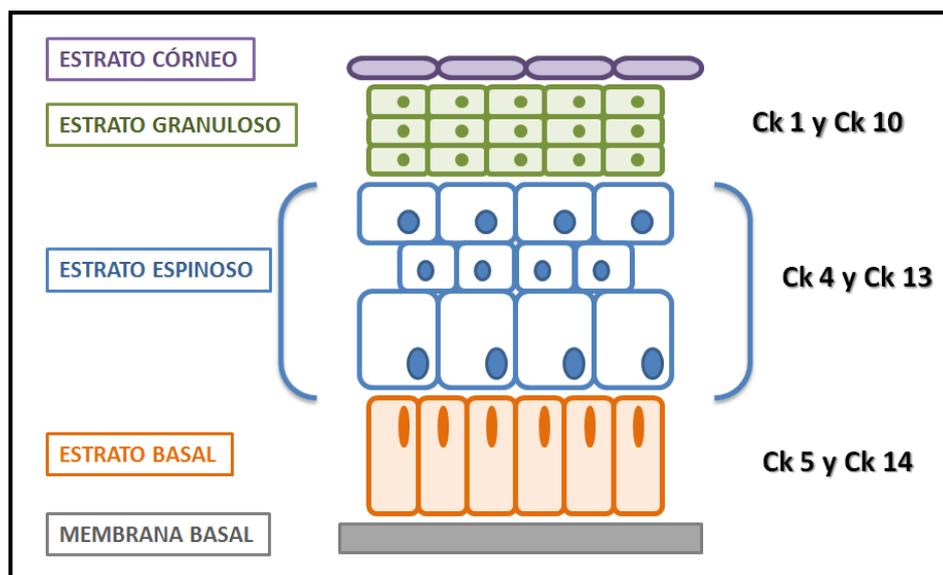


Figura 8. Distribución de la expresión de proteínas de filamento intermedio (citoqueratinas) en los diferentes estratos del tejido epitelial.

C. TRATAMIENTO DE LA FISURA PALATINA

El tratamiento de esta patología es complejo e integral, jugando un papel fundamental el tratamiento quirúrgico. El tipo de reparación y el momento en que se realice vendrán determinados inicialmente por las malformaciones acompañantes. Normalmente, el paladar debe estar reparado antes del inicio del lenguaje, es decir, antes de los 18 meses de edad, para conseguir unos resultados óptimos. La mayor parte de estudios coinciden que la posibilidad de obtener un lenguaje adecuado en los pacientes con fisura palatina está relacionado con cirugías tempranas; y que el cierre tardío del paladar tiene efectos negativos sobre la voz y el habla desarrollados por el paciente. (*Bardach, Morris et al. 1984; Witzel, Salyer et al. 1984; Rohrich, Rowsell et al. 1996; Chapman 2004*)

A lo largo de la historia se han descrito múltiples técnicas destinadas a la reparación de la fisura palatina. La realización de la cirugía en uno o dos tiempos va a depender de que la fisura afecte sólo al paladar blando o que se extienda por todo el paladar, y del grado de dehiscencia entre los procesos laterales de la fisura. A veces, cuando la fisura es muy amplia, la mucosa de los procesos laterales puede ser insuficiente para corregir el defecto, con lo que se hace necesario recurrir a la utilización de otros tejidos, tales como injertos mucosos o de piel.

Cuando existe afectación de todo el paladar la corrección en un tiempo puede dar lugar a un pobre desarrollo del maxilar, destacando como causas relacionadas con su producción: la interrupción del aporte vascular, la contractura que la cicatriz de las incisiones de descarga generan, la incorporación del periostio maxilar en los colgajos palatinos, la edad del paciente, y la severidad de la fisura o factores genéticos, entre otros. La cirugía en dos tiempos, cerrando en primer lugar el paladar blando, permite el cierre del paladar duro con disecciones menos extensas del paladar óseo, gracias a la aproximación previa de los procesos palatinos, limitando así el daño de los centros de crecimiento del maxilar. Normalmente, el segundo tiempo operatorio sobre el paladar duro se realiza una vez que el maxilar ha completado la

mayor parte de su desarrollo (5 a 7 años) y suele ser utilizando un colgajo vomeriano. (Hotz and Gnoinski 1979; Friede and Enemark 2001)

I. Técnicas Quirúrgicas

El principal objetivo del cierre de la fisura palatina es la movilización de los tejidos palatinos hasta la aproximación tisular sin o con mínima tensión. La palatoplastia se centra sobre todo en tres técnicas quirúrgicas básicas, de las que han aparecido combinaciones y modificaciones, pero que siguen siendo la base de la cirugía del cierre del paladar. (Lubker 1975)

Una de las primeras técnicas descritas fue la de **Bernard Von Langenbeck** en 1861. Dicho autor describía el cierre de la fisura palatina levantando dos colgajos de mucoperiostio del paladar duro. Se realiza una aproximación de lado a lado de los márgenes de la hendidura del paladar duro y del blando, con separación de las fibras del músculo elevador de su inserción ósea, y con incisiones laterales de descarga. Presentando diferentes modificaciones según el grado de afectación del paladar (Leon Pérez J.A. 2009) (Figura 9 y 10).

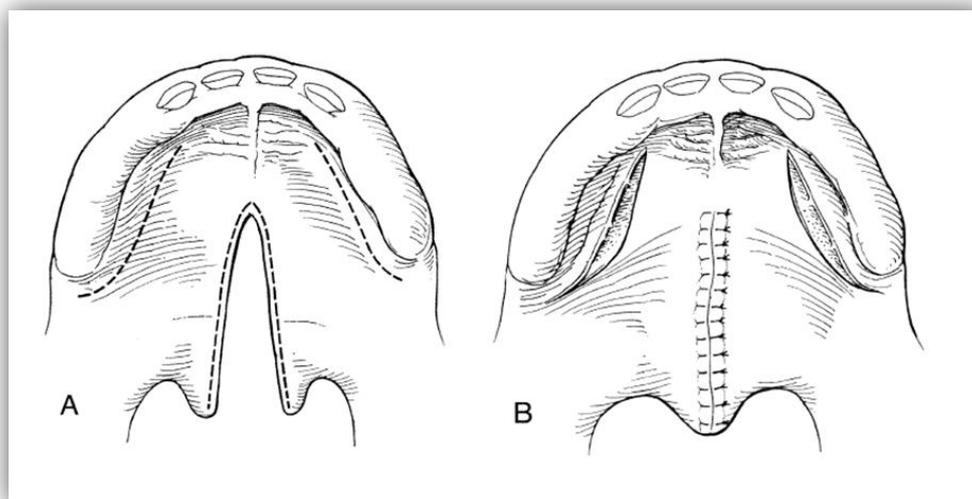


Figura 9. Técnica de Von Langenbeck (cierre simple) (McCarthy 1990; Mathes 2006)

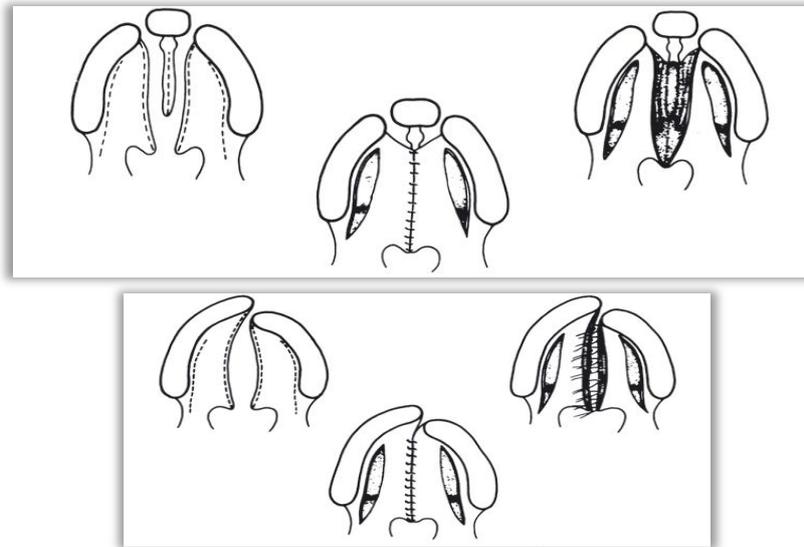


Figura 10. Técnica de Von Langenbeck para la fisura palatina completa: A. bilateral y B. unilateral.

(McCarthy 1990; Mathes 2006)

Puesto que esta intervención no proporciona longitud al paladar, en el último siglo los esfuerzos se han dirigido hacia técnicas que permitan alargar lo máximo posible el paladar para así prevenir el posible desarrollo de una insuficiencia velofaríngea.

Uno de los procedimientos más utilizados es la técnica de **Veau-Wardill-Kilner**. En 1932 Veau publicó un trabajo utilizando dos tiempos para realizar la palatoplastia, en primer lugar realizaba la reparación de la fisura alveolar y del labio, y luego reparaba el paladar utilizando un colgajo vomeriano. Por su parte, Wardill publicó de manera independiente lo que se denominó la cirugía de retroposición palatina en V-Y, más agresiva que la de Veau. Y con posterioridad, en 1937, ambas técnicas se fusionaron, adaptando la técnica de Veau para el tratamiento del segmento anterior de la fisura, resultando así la conocida técnica de Veau-Wardill-Kilner (Figura 11). Dentro de los aspectos técnicos de dicho procedimiento destacan la realización de incisiones de descarga laterales, la existencia de colgajos bilaterales dependientes de la arteria palatina mayor, el cierre del plano mucoso de manera separada, la realización de una fractura en el hamulus (gancho de la apófisis pterigoidea interna), el cierre del plano muscular y la

elongación de tipo V-Y en el paladar. Las principales deficiencias de esta técnica son la presencia de áreas cruentas laterales y la afectación variable en el crecimiento del maxilar.

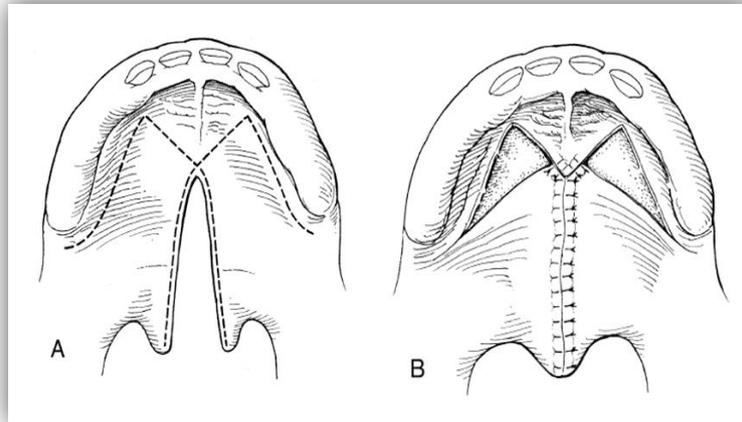


Figura 11. Técnica del triple colgajo de Veau-Wardill-Kilner. (McCarthy 1990; Mathes 2006)

La **veloplastia intravelar** es una técnica que fue descrita inicialmente en 1964 por Braithwaite y por Otto Kriens en 1969 (*Kriens 1969*); en ella se realiza la reposición del músculo elevador del velo del paladar, lo cual constituye un avance en la reconstrucción del esfínter velofaríngeo. Esta técnica fue actualizada en 2003 por Sommerlad (*Sommerlad 2003*), que reconstruye el plano muscular rotando al músculo elevador en conjunto con los músculos palatogloso y palatofaríngeo. Cutting describió dicha reconstrucción del plano muscular con la rotación tan sólo del músculo elevador del paladar. Su técnica se basa en la desinserción anterior del plano muscular inicialmente, seguida de la tenotomía del tendón del músculo elevador del velo del paladar y su tenopexia a la apófisis pterigoidea interna, para finalmente reconstruir el plano muscular (*Figura 12*). La veloplastia intravelar ha permitido conseguir una incidencia de insuficiencia velofaríngea cercana al 5% con el tratamiento inicial de la fisura palatina.

Otra técnica conocida y con buenos resultados funcionales (incidencia de insuficiencia velofaríngea alrededor del 7%) es la técnica de **Furlow** (*LaRossa, Jackson et al. 2004*), descrita en 1980. En ella se combina la realización de la reposición del plano muscular, con una correcta desinserción y tenotomía del elevador, con la elongación del paladar, realizando una doble Z plastia inversa de oposición músculo-mucosa, que no incluye incisiones laterales

de descarga. En dicha técnica se defiende que para obtener una correcta función del esfínter velofaríngeo es tan importante la reconstrucción del plano muscular como la elongación del paladar (*Figura 13*).

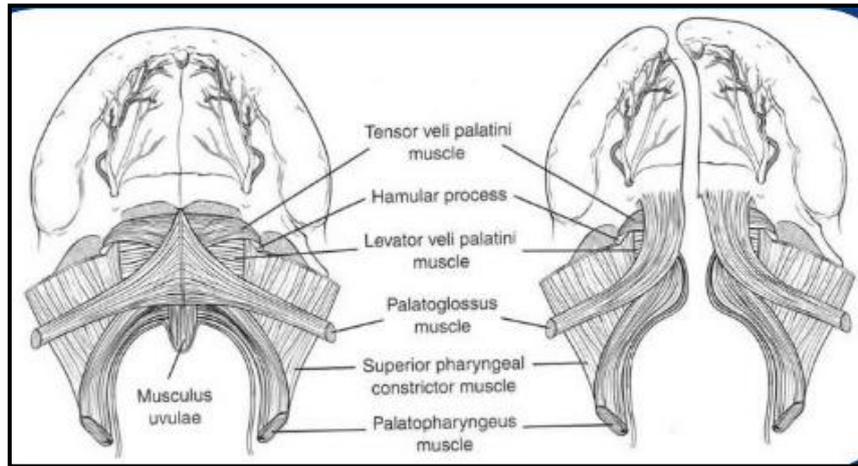


Figura 12. Representación esquemática de la posición de los músculos en el paladar. (Sadove 2004)

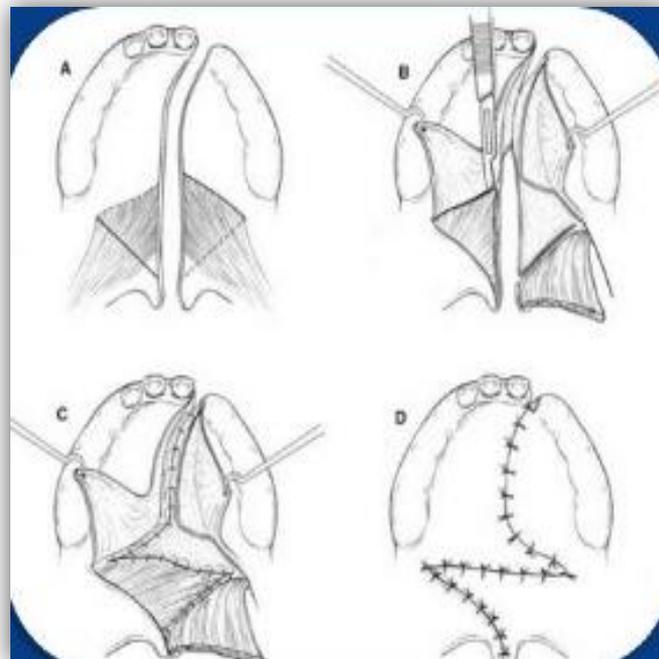


Figura 13. Técnica de Furlow (Sadove 2004)

La complicación quirúrgica más frecuente y común en todas técnicas utilizadas para la reparación del paladar, es la aparición de *fístulas oronasales*, que pueden aparecer en cualquier punto a lo largo de la fisura original. Tienen una incidencia de hasta el 34% y generalmente son debidas a suturas con tensión. El problema principal para su corrección depende de su tamaño y viene determinado por la existencia de tejido cicatricial fibroso circundante, de escasa distensibilidad, que hace necesaria a veces la utilización de injertos o colgajos procedentes de otras zonas. (Oldham 2005)

3. INGENIERÍA TISULAR

El término **Ingeniería Tisular** ha sido definido por *la Nacional Science Foundation* como “La aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el entendimiento fundamental de la relación entre estructura y función de tejidos normales y patológicos para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la actividad de los tejidos u órganos perdidos o dañados”.

La Ingeniería Tisular es una de las áreas de la biotecnología que más se ha desarrollado en los últimos años, debido a su capacidad para la fabricación *in vitro* de tejidos y órganos para su implante posterior en pacientes necesitados de estos tejidos. Su capacidad para regenerar tejidos del propio paciente a partir de células extraídas del mismo, confiere a esta disciplina una gran potencialidad dentro del campo de la medicina regenerativa.

Para generar estos nuevos tejidos la Ingeniería Tisular emplea tres herramientas básicas: ***células con capacidad de replicación (células madre o troncales), matrices extracelulares y factores de crecimiento***. Las células sintetizan proteínas necesarias para el desarrollo de la matriz extracelular, mientras que ésta proporciona un ambiente adecuado para la proliferación de las células. Por su parte, los factores de crecimiento facilitan y promueven la regeneración del nuevo tejido.

A. CÉLULAS MADRE O TRONCALES

Las células madre o troncales se definen como aquellas células con gran capacidad para dividirse y diferenciarse en distintas líneas celulares más especializadas, no sólo morfológicamente sino también a nivel funcional. *(Smith 2006)*

La fuente a partir de la cual se obtienen las células tiene una gran influencia en el éxito del tejido a reparar. La utilización de células autólogas es la más apropiada para llevar a cabo los protocolos de la Ingeniería Tisular.

Las células madre o troncales se pueden clasificar principalmente según dos criterios: la potencialidad y el origen. *(Montalvo 2008)*

I. Según la Potencialidad

La potencialidad se define como la capacidad para diferenciarse en distintos tipos celulares *(Figura 14)*. Tradicionalmente, las células madre humanas se han clasificado como totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales o unipotenciales, según se describe a continuación:

- Totipotenciales: Son células capaces de diferenciarse tanto en tejido embrionario (por ejemplo: tejido nervioso, músculo, etc.) como en tejido extraembrionario (placenta y anejos placentarios). Solamente constituirían células madre totipotenciales los estadios iniciales del desarrollo (zigoto, blastómeras y células de la mórula).
- Pluripotenciales: Son aquellas que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquiera de los tejidos existentes en un organismo adulto, y por tanto, a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) incluyendo las células germinales. Las células pluripotenciales son las del polo superior del blastocisto (*Figura 15*).
- Multipotenciales: Son las capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares, pero siempre restringiendo su potencialidad a tejidos derivados de una misma capa embrionaria, es decir, tejidos derivados del ectodermo, mesodermo o endodermo. En el organismo adulto y en el feto existen numerosos tipos de células multipotenciales, destacando, por ejemplo, las células de la médula ósea, que pueden diferenciarse a eritrocitos, leucocitos o plaquetas.
- Unipotenciales: Son células que tienen capacidad para formar un único linaje celular. Por ejemplo, células troncales queratinocíticas de la capa basal del epitelio de la mucosa oral.

Hoy en día, sin embargo, sabemos que esta clasificación es muy flexible, existiendo la posibilidad de que una célula de tipo unipotencial adquiriera capacidad multipotencial o pluripotencial bajo determinadas circunstancias. Conceptos como el de transdiferenciación, que se tratará más adelante, contribuyen a replantear este tipo de clasificaciones.

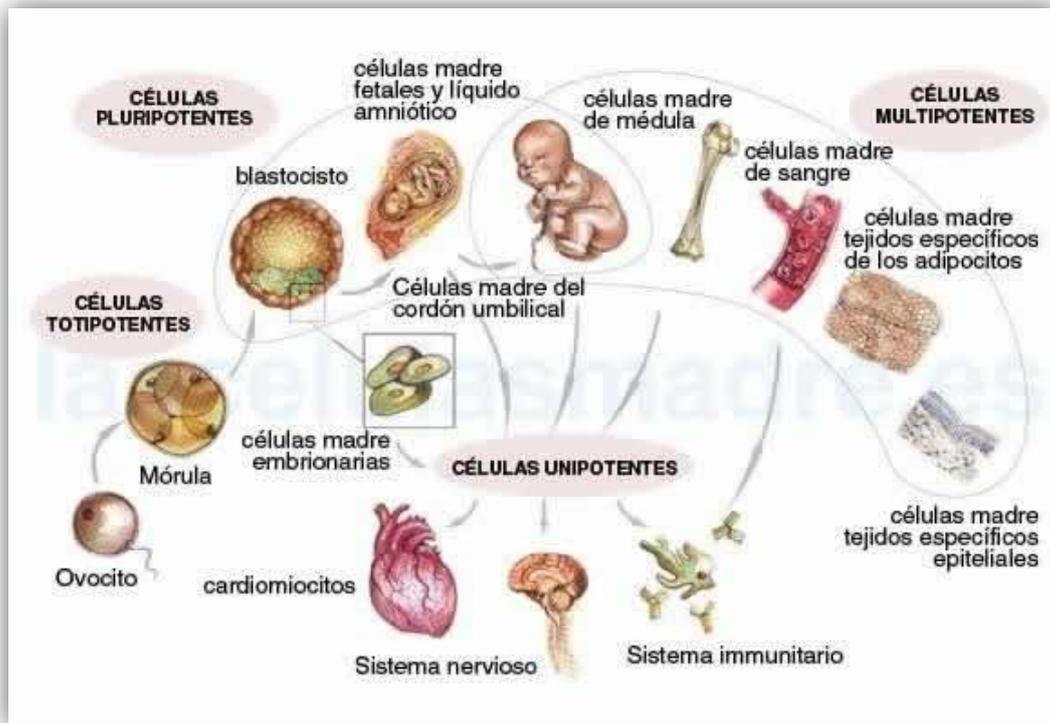


Figura 14. Esquema de la clasificación de las células madre según su potencialidad.

(<http://lascelulasmadre.es/tipos>)

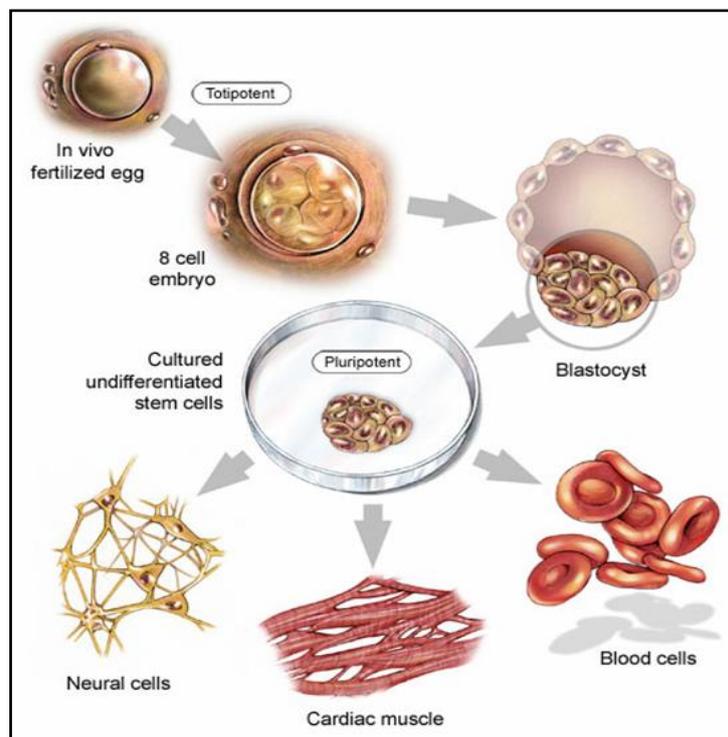


Figura 15. Células madre pluripotenciales (<http://lascelulasmadre.es/pluripotentes>)

II. Según el Origen

El origen está en relación con el momento del desarrollo del cual han surgido, según esto las células madre clásicamente se han dividido en:

- Embrionarias: Células que existen únicamente durante el periodo embrionario (*Figura 16*). Se pueden obtener a partir de la masa de células interna del blastocisto en el estadio de embrión preimplantatorio, (*Evans and Kaufman 1981; Martin 1981; Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998*), o bien, de la cresta gonadal. (*Matsui, Toksoz et al. 1991; Resnick, Bixler et al. 1992; Shambloott, Axelman et al. 1998*). Estas células madre son pluripotenciales, por tanto, se pueden diferenciar en cualquier tejido del organismo, incluyendo tejidos somáticos (corazón, hígado, etc.) y células germinales (ovocitos y espermatozoides). (*Geijsen, Horoschak et al. 2004*)

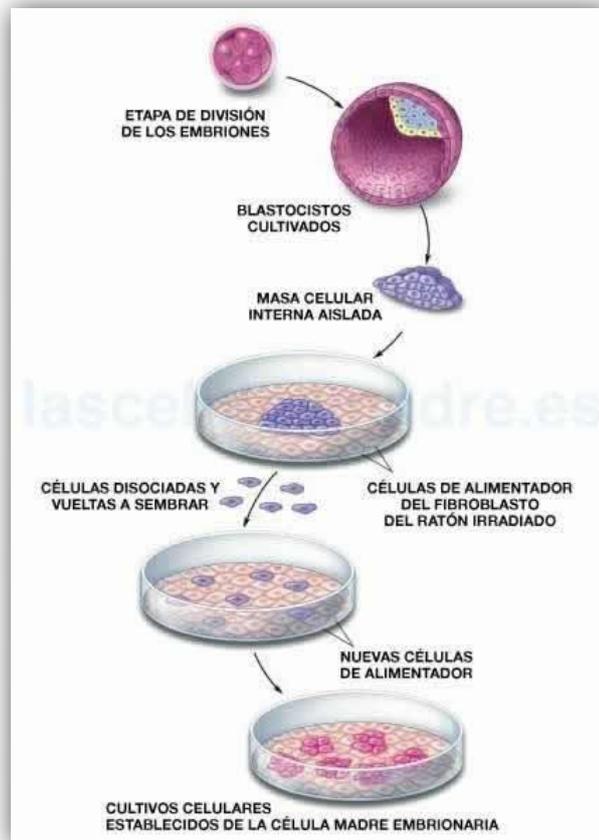


Figura 16. Células madre embrionarias. (<http://lascelulasmadre.es/embrionarias>)

- Adultas: Células presentes en el adulto, el feto y el cordón umbilical, que tienen capacidad proliferativa y potencial de diferenciación menor que las células madre embrionarias. Son células multipotenciales o unipotenciales, y se han podido identificar en casi todos los tejidos del organismo. (Raff 2003) Dentro de las células troncales adultas se incluye un grupo celular denominado células madre mesenquimales o células progenitoras mesenquimales. Este tipo de células se encuentran repartidas en el tejido conectivo de diversos órganos como la médula ósea (Friedenstein, Chailakhyan et al. 1974), la sangre periférica (Zvaifler, Marinova-Mutafchieva et al. 2000), el cordón umbilical (Troyer and Weiss 2008), el hueso trabecular (Noth, Osyczka et al. 2002), el tejido adiposo (Pittenger, Mackay et al. 1999), el tejido sinovial (De Bari, Dell'Accio et al. 2001), en los dientes deciduales (Miura, Gronthos et al. 2003), en el músculo esquelético (Jankowski, Deasy et al. 2002) y en algunos tejidos del feto. (Hu, Liao et al. 2003; in 't Anker, Noort et al. 2003) En las últimas décadas, estas células han sido estudiadas y utilizadas por la Ingeniería Tisular con resultados bastante exitosos (Figura 17). En la presente Tesis Doctoral se utilizarán células madre mesenquimales adultas obtenidas del tejido adiposo, a las cuales dedicaremos un apartado independiente de esta Introducción.

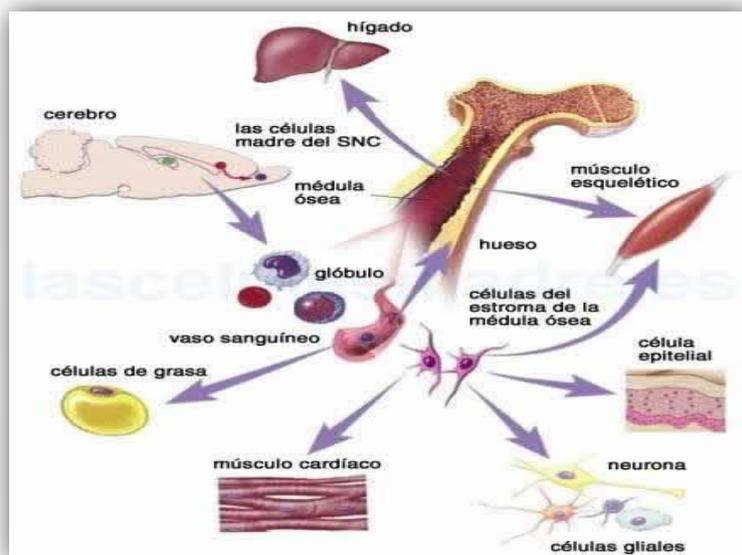


Figura 17. Esquema de obtención de células madre adultas a partir de la médula ósea.

(<http://lascelulasmadre.es/medula-espinal>)

Recientemente, en relación a las células madre o troncales, se ha demostrado la existencia de células adultas maduras que tienen capacidad de diferenciarse a células de otro linaje sin que tengan que revertir a célula madre o progenitora, a esta capacidad de transformación se le ha denominado **transdiferenciación celular**. (Tsai R.Y. 2002; Thowfeequ, Myatt et al. 2007)

Este fenómeno en las células puede deberse:

- 1) a una *mutación* en la secuencia de nucleótidos del ADN.
- 2) a *modificaciones epigenéticas*, es decir, cambios que ocurren a nivel del genoma que no se deben a modificaciones de la secuencia de nucleótidos, sino a modificaciones en el patrón de expresión génica por procesos de metilación o acetilación del ADN, modificación de histonas u otros procesos epigenéticos.
- 3) a otros *factores ambientales* que intervienen en los cambios que se producen en la expresión génica.

Este concepto contrasta con el de **diferenciación**, que engloba una serie de etapas encaminadas a conseguir que una célula inmadura o indiferenciada modifique su fenotipo y morfología para llegar a ser una célula adulta madura (célula diferenciada), alcanzando así una estructura y función especializada. (Slack 2002)

En resumen, inducir la transdiferenciación de células diferenciadas con un fin terapéutico, podría contribuir a un importante avance de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa, disminuyendo los problemas éticos y oncológicos que derivan del uso de células madre embrionarias y de la dificultad para obtener células troncales adultas en ciertos casos.

B. MATRIZ EXTRACELULAR

La mayoría de los tejidos y órganos necesitan una estructura tridimensional en la cual estén inmersas las células. En el caso de los tejidos artificiales generados en el laboratorio, esta estructura tridimensional o de soporte se denomina **matriz extracelular** o **“scaffold”**. Su función principal es similar a la de la matriz extracelular natural, es decir, facilitar y promover la proliferación, la diferenciación y la biosíntesis de las células inmersas en ella. En general, estas matrices extracelulares utilizadas para la generación de tejidos mediante Ingeniería Tisular van a estar compuestas por diferentes tipos de biomateriales.

Los biomateriales utilizados deben cumplir unos requisitos básicos como son: ausencia de toxicidad, biocompatibilidad, ausencia de potencial carcinogénico y tolerancia a la esterilización previamente a su uso. Además, deben contar con propiedades mecánicas tales como la permeabilidad, la estabilidad, la elasticidad, la flexibilidad y la plasticidad, para permitir la fabricación de formas diferentes, ya sean, láminas, geles, o estructuras tridimensionales solidas (Yang S. 2001).

Además, estos biomateriales han de permitir la adhesión celular y la activación de los diferentes factores de crecimiento (Walgenbach, Voigt et al. 2001), y servir de vehículo para transportar las células utilizadas como fuente de obtención al sitio del tejido afectado (O'Driscoll 1999). (Figura 18)

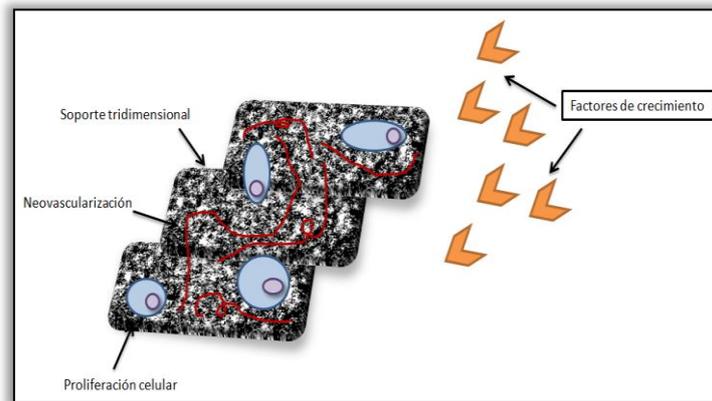


Figura 18. Las matrices extracelulares artificiales desarrolladas a partir de materiales biocompatibles permiten la adaptación y proliferación celular.

Los *biomateriales* utilizados en Ingeniería Tisular se pueden dividir en tres grupos:

- ✓ Biológicos o biogénicos
- ✓ Sintéticos
- ✓ Semisintéticos

Los materiales biológicos incluyen matrices acelulares como: colágeno, alginato, glicosaminoglicanos y fibrina. (Bumgardner et al., 2003; Saadeh et al., 2001; Seol et al., 2004; Solchaga et al., 2002; Trubiani et al., 2008). Los polímeros sintéticos incluyen ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polietilenglicol, y varios hidrogeles. (Behravesch et al., 1999; Ishaug et al., 1997; Neuss et al., 2008). Y por último, los materiales semisintéticos son una combinación entre ambos. En la presente Tesis Doctoral se utilizará un biomaterial altamente biocompatible previamente desarrollado por el grupo de investigación en Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada que demostró ser eficaz para la generación de distintos tipos de tejidos humanos y de animales de laboratorio (Garzon, Serrato et al. 2009; Gonzalez-Andrades, Garzon et al. 2009; Carriel, Garzon et al. 2012; Carriel, Garrido-Gomez et al. 2013; Garzon, Miyake et al. 2013). Además, la reciente aplicación de técnicas físico-químicas de compresión plástica a este tipo de biomaterial logró generar matrices de fibrina-agarosa nanoestructuradas de adecuadas propiedades biomecánicas (Ionescu, Alaminos et al.

2011; Scionti 2014; Scionti, Moral et al. 2014; Carriel, Scionti et al. 2015) que podrían ser de gran utilidad en la sustitución in vivo de tejidos sometidos a gran carga biomecánica como es el paladar.

C. FACTORES DE CRECIMIENTO

Una gran variedad de proteínas juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación de las células. Dichas proteínas son secretadas de forma endógena por las células o bien, son el resultado de señales paracrinas con células vecinas. A estas proteínas son lo que llamamos **factores de crecimiento**.

Los factores de crecimiento frecuentemente usados en Ingeniería Tisular son, fundamentalmente, la proteína morfogenética osea (*BMP*), el factor de crecimiento fibroblástico básico (*bFGF* ó *FGF-2*), el factor de crecimiento vascular epitelial y el factor de crecimiento transformante-b (*TGF-b*) (*Knight MA 2004; Lavik E 2004*) (*Figura 18*).

Por otra parte, la adición de los factores de crecimiento adecuados a las células y a la matriz extracelular artificial, promueve la regeneración de los tejidos en comparación con aquéllos en los que no existen estos factores de crecimiento. (*Knight MA 2004; Lavik E 2004*)

4. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO

Una de las fuentes de células madre adultas más importantes para la generación de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular es el tejido adiposo humano, el cual contiene un gran número de *células madre mesenquimales del tejido adiposo (ADSCs)*. (De Ugarte DA 2003; Mitchell JB 2003; Schaffler A 2007)

La existencia de células madre en el tejido adiposo subcutáneo con elevado potencial para diferenciarse en células de cartílago, hueso, músculo o tejido nervioso, fue demostrada hace años, aunque son muy pocos los grupos que han utilizado estas células terapéuticamente en combinación con biomateriales para generar tejidos mediante Ingeniería Tisular.

A. TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es una forma especializada de tejido conectivo, y está constituido principalmente por grupos de células adiposas o **adipocitos**. Su principal función es el almacenamiento y la movilización de reservas energéticas en forma de triglicéridos. Los elementos celulares asociados al tejido adiposo lo forman preadipocitos, fibroblastos, células de tejido muscular liso, células endoteliales, monocitos, macrófagos y linfocitos, así como células mesenquimales indiferenciadas a ADSCs.

En el ser humano se identifican dos variedades bien diferenciadas de tejido adiposo:

- ✓ El tejido adiposo unilocular o “grasa amarilla”, cuyas células contienen una sola vacuola de lípido almacenado. Es la variedad más común. (Figura 19)
- ✓ El tejido adiposo multilocular o “grasa parda”, más escaso y cuyas células contienen varias vacuolas lipídicas. Variedad muy frecuente en el recién nacido. (Figura 20)

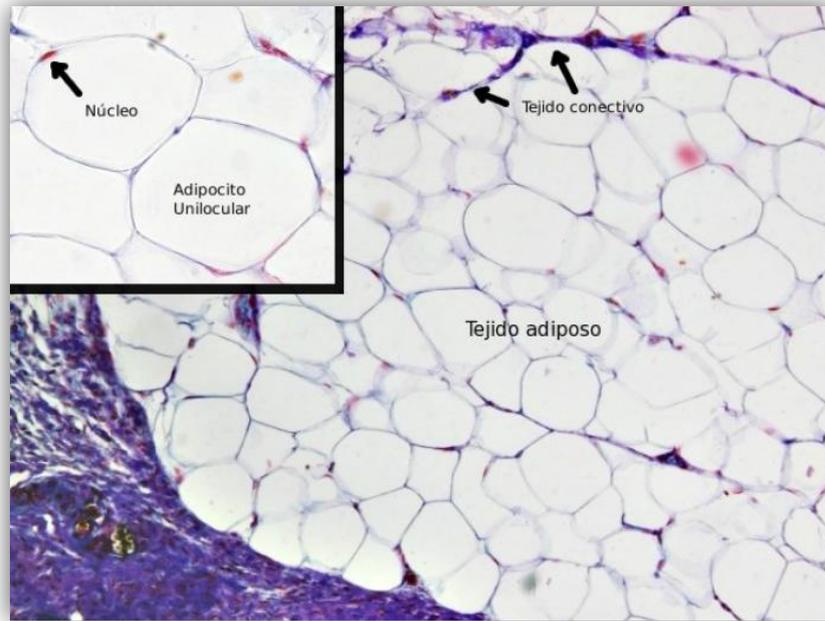


Figura 19. Tejido adiposo unilocular. (Molist P 2014)

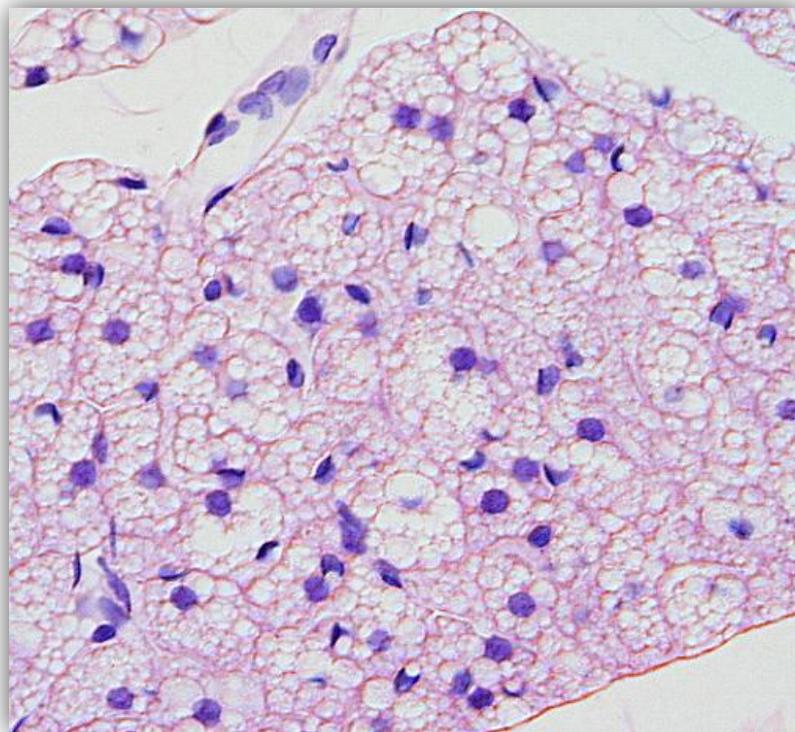


Figura 20. Tejido adiposo multilocular. (Molist P 2014)

Las células adiposas se originan por diferenciación de células mesenquimales primitivas a partir del 5º mes de vida fetal, pero el proceso para los dos tipos de tejido adiposo es diferente. Las células adiposas totalmente desarrolladas no sufren más mitosis y tras el nacimiento sólo se forman nuevas células adiposas a partir de células mesenquimales indiferenciadas. Al crecimiento postnatal de tejido adiposo por división de las células mesenquimales indiferenciadas se denomina *Crecimiento Hiperplásico*; por otro lado, también puede aumentar la cantidad de tejido por *Crecimiento Hipertrófico*, es decir, por aumento del tamaño de los adipocitos como consecuencia de acumulación intracelular de lípidos. (Figura 21)

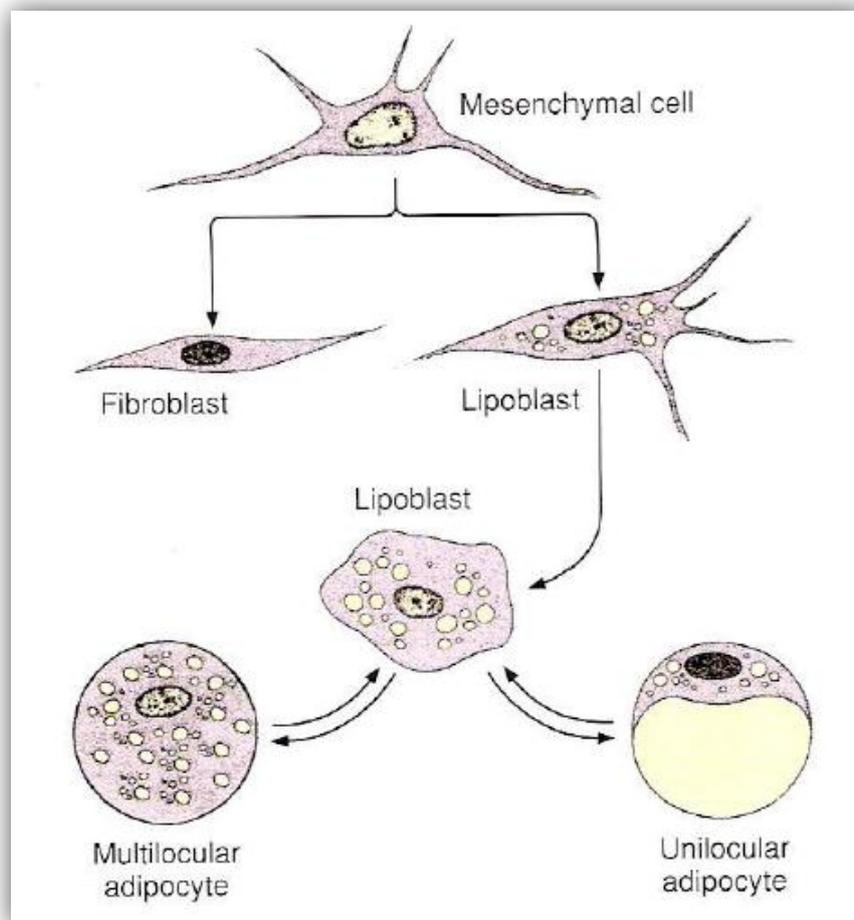


Figura 21. Esquema de la Adipogénesis. (Montalvo Arenas 2010)

B. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL TEJIDO ADIPOSO

Para diferenciar a las ADSCs de otros tipos celulares presentes en el tejido adiposo, existen diversos estudios que muestran su expresión fenotípica característica de células troncales. Así, las ADSCs expresan gran variedad de marcadores de superficie, tales como: CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, TLRs-tool-like receptors TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6 y TLR-9, STRO-1. (Simmons PJ 1991; De Ugarte DA 2003; Cho HH 2005; Schaffler A 2007)

El comité de tejidos de células madre mesenquimales establece que los criterios que deben cumplir estas células son los siguientes: (Dominici, Le Blanc et al. 2006)

- Expresar: **CD73, CD90 y CD105.** (Figura 22)
- No expresar *kit-c*: **CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 α .**
- No expresar **(HLA)-DR.**
- Tener potencialidad para diferenciarse a las estirpes **osteogénica, condrogénica y adipogénica.**
- Tener afinidad para adherirse a frascos de cultivo de material plástico in vitro.

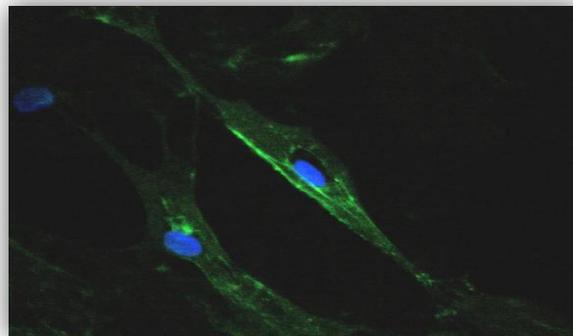


Figura 22. Expresión del marcador CD73, indicador de ADSCs en cultivos de en un modelo bidimensional. (Nieto Aguilar 2010)

Hasta la actualidad, las ADSCs han sido diferenciadas a varios tipos de tejidos en modelos bidimensionales, incluyendo la diferenciación de ADSCs a hueso (*Xu Y 2005; Weinzierl, Hemprich et al. 2006; Romagnoli, Zonefrati et al. 2015*), cartílago (*Wei, Sun et al. 2007; Shafiee, Kabiri et al. 2015*), tejido adiposo (*Yoshimura K 2008*) y neuronas (*Lin, Xin et al. 2008; Qin Y 2015*). Existen trabajos que han evaluado su diferenciación utilizando algún tipo de soporte tridimensional. Así, para generar hueso se han utilizado quitosan (*Im GI 2005*), fibrina (*B Malafaya PP, Pedro et al. 2005*) y fosfato tricálcico (*Hattori H 2006*); para cartílago: agarosa y alginato o gelatina (*Awad, Wickham et al. 2004; Lin, Luo et al. 2005; Mehlhorn, Niemeyer et al. 2006*); y para tejido adiposo: Alloderm (*Yoo G 2009*).

En este contexto, el biomaterial de fibrina y agarosa previamente desarrollado por nuestro grupo de investigación (*Alaminos, Garzon et al. 2007; Sanchez-Quevedo, Alaminos et al. 2007; Garzon, Sanchez-Quevedo et al. 2009; Carriel, Garzon et al. 2012; Carriel, Garrido-Gomez et al. 2013; Garzon, Miyake et al. 2013*), demostró capacidad inductora para la diferenciación osteogénica in vitro de las ADSCs (*Nieto Aguilar R 2011*). Dichas células han demostrado índices de adhesión y diferenciación muy adecuados en estos biomateriales. Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado demostrar la capacidad de diferenciación in vivo de las células ADSCs combinadas con biomateriales de fibrina-agarosa.

OBJETIVOS

El **Objetivo Principal** de esta tesis doctoral es la construcción de sustitutos palatinos utilizando cultivos celulares y biomateriales biocompatibles, y su evaluación tanto *ex vivo* como *in vivo* para determinar su posible utilidad clínica futura.

Para ello se establecen los siguientes **Objetivos Específicos**:

- Establecer y estandarizar las condiciones de laboratorio para el cultivo de células epiteliales y estromales de la mucosa palatina y células madre mesenquimales del tejido adiposo de animales de experimentación y determinar los pases celulares más adecuados para la utilización de estas últimas en protocolos de ingeniería tisular.
- Elaborar sustitutos nanoestructurados de mucosa palatina mediante ingeniería tisular utilizando para ello matrices extracelulares nanoestructuradas de fibrina y agarosa con células estromales en su interior y células epiteliales en su superficie y determinar su utilidad para la reparación de la mucosa palatina en un modelo animal mediante análisis morfométricos e histológicos.
- Construir sustitutos de hueso palatino utilizando para ello matrices extracelulares nanoestructuradas de fibrina y agarosa con células madre mesenquimales del tejido adiposo en su interior, siendo sometidas a la técnica de transdiferenciación osteogénica y determinar su utilidad para la reparación del hueso palatino en un modelo animal mediante análisis morfométricos e histológicos..

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

En la presente Tesis doctoral se ha realizado un estudio experimental básico de naturaleza prospectiva, en el cual se han obtenido muestras de espesor total de mucosa palatina y de tejido adiposo de animales de experimentación para la construcción de sustitutos mucosa palatina y hueso nanoestructurados, y su posterior evaluación de viabilidad *in vitro* e *in vivo* en dichos animales.

Las principales limitaciones de dicha investigación residen en la capacidad de proliferación y supervivencia de las muestras de células obtenidas para el estudio, ya que los cultivos celulares, especialmente las células epiteliales, requieren la utilización de medios de cultivo y de factores de crecimiento específicos para células diferenciadas, lo cual a veces dificulta el crecimiento y la viabilidad de las mismas; y en conseguir su supervivencia tras la implantación en animales de experimentación para poder evaluar su utilidad en un modelo de fisura palatina en animales de experimentación.

Las diferentes muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral se obtuvieron a partir de animales de experimentación, tal como se describe a continuación.

1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Las muestras de mucosa palatina y tejido adiposo subcutáneo provienen de animales de experimentación, y se obtienen a partir de conejos machos (*New Zealand White*) de entre 400 y 500 gramos de peso y aproximadamente unas 3-4 semanas de vida. (*Figura 23*)

Todos los animales utilizados para dicha Tesis han sido adquiridos en el *Centro de Instrumentación Científica y Animalario de la Universidad de Granada*, y se mantienen en la Unidad de Experimentación del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, en cuyos quirófanos se han realizado las intervenciones para la obtención de muestras, y los cuidados pre y postoperatorios de los ejemplares del estudio.



Figura 23. Animales de experimentación utilizados.

El proyecto atiende a la normativa legal vigente, en cuanto al cuidado, transporte, experimentación y sacrificio de los animales. *RD 1201/105 y ley 32/2007*.

1.2 MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

El procedimiento de obtención de muestras se realiza con los animales anestesiados mediante fluorane inhalado, previa preanestesia por inyección intramuscular de *ketamina* y *xilacina* (dosis dependiente del peso, que se comprueba previo a cada actuación).

Se toman dos muestras independientes de cada animal (*Figura 24*):

- Mucosa palatina: Realizando pequeña incisión con bisturí circular en zona anterior del paladar duro ligeramente lateralizado hacia la derecha.
- Tejido adiposo subcutáneo: Obtenido a partir de una incisión a nivel inguinal (zona previamente rasurada), que es donde podemos encontrar una pequeña masa de tejido adiposo en este tipo de animales de experimentación.

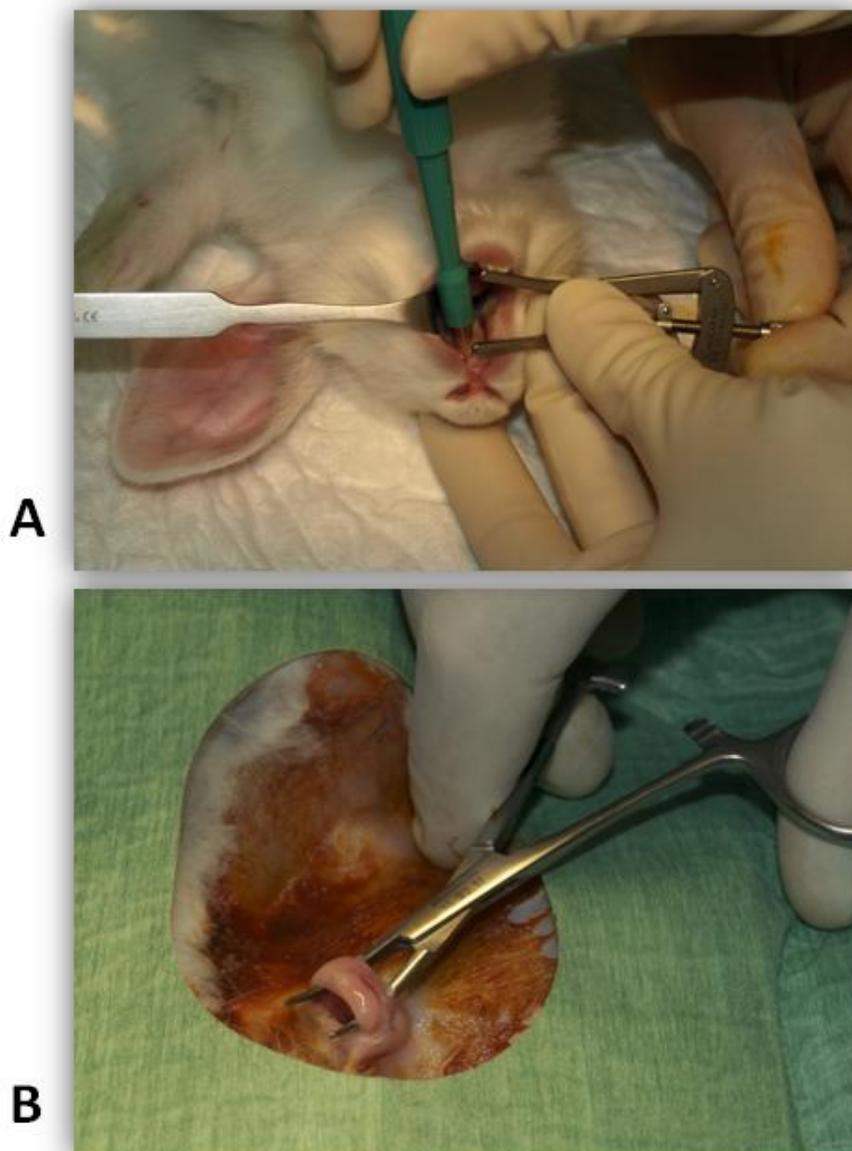


Figura 24. Toma de muestras de mucosa oral (A) y de grasa inguinal (B) de los animales de experimentación.

Todas las muestras utilizadas para este estudio fueron introducidas inmediatamente tras su extracción en medio de transporte estéril, constituido por medio de cultivo RPMI suplementado con antibióticos (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomina) y antimicóticos (1,25 µg/ml de anfotericina B) para evitar una eventual contaminación de la muestra, y mantenidas a 4°C hasta el momento de su procesamiento.

2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Dentro de las primeras 24h tras su extracción se procede al procesamiento de los tejidos obtenidos para la independización de los distintos grupos celulares para su posterior cultivo y expansión *in vitro*. Para lo cual, inicialmente, las muestras se lavan dos veces en una solución estéril de PBS (*phosphated buffered saline*) con penicilina, estreptomina y anfotericina B (500 U/ml, 500 g/ml y 1,25 g/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las mismas.

Posteriormente, y para la individualización de las células madre contenidas en dichos tejidos, es necesario que las muestras sean fragmentadas mecánicamente y sometidas a diversas enzimas, en el proceso conocido como ***digestión enzimática***.

En las muestras de mucosa oral, son diversas las enzimas que se utilizaron para conseguir la separación del epitelio y del estroma, mediante diversos mecanismos. La tripsina-EDTA (*ácido etilendiaminotetraacético*) y la colagenasa I de *Clostridium histolyticum* son enzimas que liberan las células del estroma dejando intacto el epitelio para su posterior crecimiento. Por otra parte, la dispasa II es una enzima que separa estas células por fragmentación de la membrana basal que actúa de límite entre ambos grupos celulares, independizando así, los queratinocitos del epitelio y los fibroblastos del estroma.

En nuestro caso, las muestras de mucosa palatina se digirieron en dispasa II a 4°C durante 12h. Tras ello, el corion o tejido conectivo fue sometido a digestión mediante incubación durante 6h con colagenasa I al 0,2% en medio de cultivo DMEM. Dicha solución se caracteriza porque es capaz de digerir el colágeno del corion y liberar los fibroblastos estromales dejando intacto el epitelio. Una vez transcurrido el tiempo mencionado, se centrifugó la solución de digestión a 1000 rpm durante 10 minutos para recoger los fibroblastos liberados del estroma. Por otro lado, el epitelio individualizado mediante la digestión con dispasa II fue digerida en una solución de tripsina-EDTA a 37°C durante 20 minutos bajo agitación moderada, la cual fue inactivada con suero bovino fetal al final de este periodo. Para la obtención de las células individualizadas, la solución se centrifugó igualmente a 1000 rpm durante 10 minutos. Todo el proceso se ilustra en la *Figura 25*.

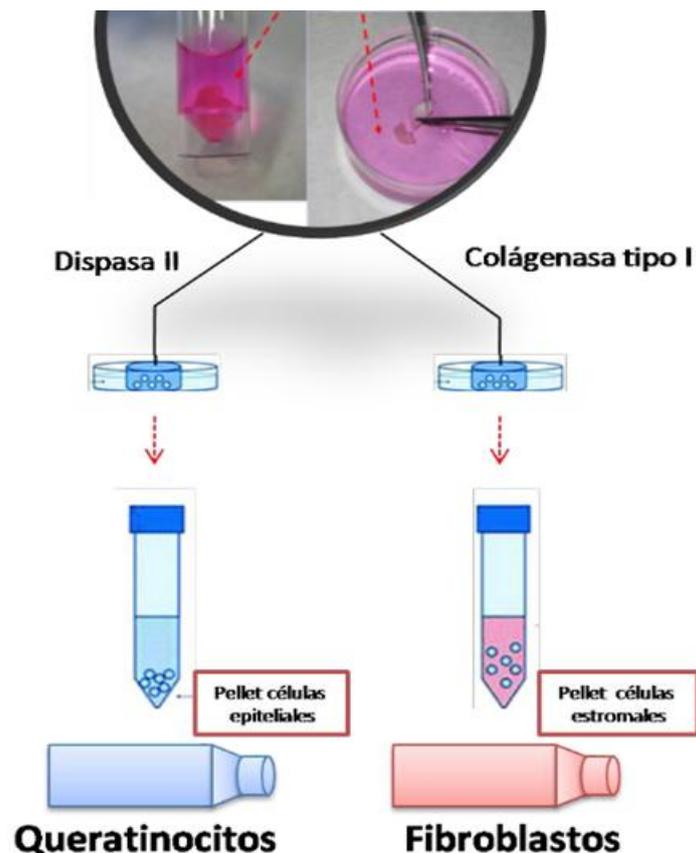


Figura 25. Esquema del procesamiento de las muestras de mucosa oral para la obtención de queratinocitos y fibroblastos para sus cultivos posteriores.

Por su lado, las muestras de células madre de tejido adiposo fueron digeridas enzimáticamente gracias a la acción de la colagenasa II de *Clostridium histolyticum* que se deja actuar durante 8 horas a 37°C. Para finalizar, se obtienen las células madre mesenquimales aisladas mediante centrifugación. (Figura 26)

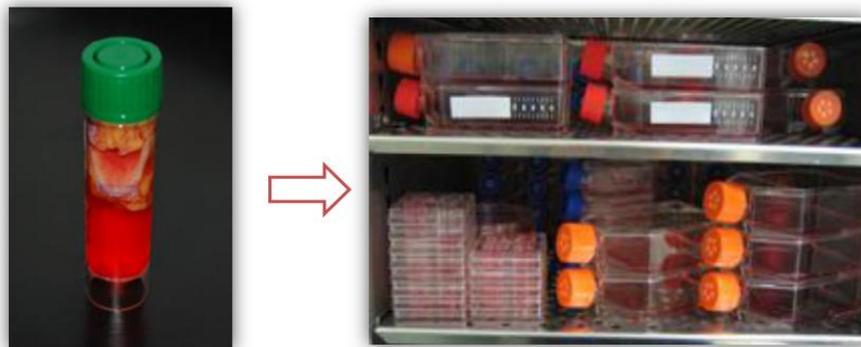


Figura 26. Procesamiento para la generación de cultivos primarios de ADSCs a partir de muestras de tejido adiposo.

2.1 DESARROLLO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS DE MUCOSA ORAL

Las células obtenidas mediante digestión de las muestras se cultivaron en medios de cultivo específicos para cada tipo celular, siguiendo protocolos previamente establecidos por el grupo de investigación. (Alaminos M 2006; Alaminos, Garzon et al. 2007; Sanchez-Quevedo, Alaminos et al. 2007; Garzon, Sanchez-Quevedo et al. 2009)

Como medio de cultivo para **fibroblastos**, se utilizó medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) enriquecido en glucosa y suplementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G y 100 mg/ml de estreptomina y 0,25 mg/ml de anfotericina B) y suero bovino fetal (SBF) al 10%. A este medio básico de cultivo lo denominamos MF (medio de fibroblastos) (Figura 27A). Este mismo medio fue utilizado para el cultivo de las células ADSCs.

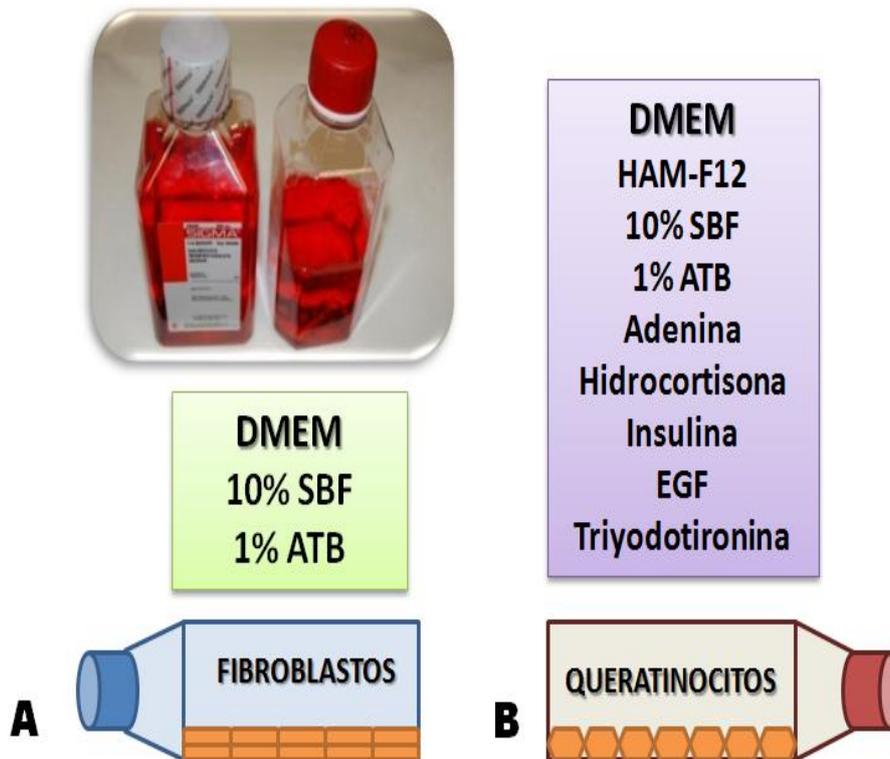


Figura 27. Cultivos primarios de fibroblastos (A) y de queratinocitos (B) a partir de pequeñas biopsias de mucosa oral.

Para la obtención de cultivos primarios de **queratinocitos**, se utilizó medio de cultivo específico para queratinocitos, conocido con el nombre de QC, el cual favorece principalmente el crecimiento de las células epiteliales (Figura 27B).

La composición del medio QC es la siguiente:

- 1) Medio HAM-F12, rico en nutrientes.
- 2) Medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)
- 3) Suero bovino fetal (SBF) a concentración final del 10%
- 4) Adenina (24 µg/ml)
- 5) Solución antibiótica y antifúngica especial para cultivos celulares hasta una concentración final del 1% (equivalente a 100 U/ml de penicilina G, 100 g/ml de estreptomicina y 0.25 g/ml de anfotericina B).

- 6) Factores de crecimiento para células en cultivo:
- Insulina (5 g/ml)
 - Triiodotironina (1.3 ng/ml)
 - Hidrocortisona (0.4 g/ml)
 - Factor de crecimiento epidérmico (10ng/ml)

En todos los casos, las células fueron incubadas a 37°C y 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo fueron recambiados bajo campana de flujo vertical cada 48-72h.

2.2 SUBCULTIVO DE CÉLULAS PROCEDENTES DE CULTIVOS PRIMARIOS DE MUCOSA ORAL Y DE CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO (ADSCs)

Una vez alcanzada la confluencia celular, los distintos cultivos 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 a 37°C durante 5 minutos para disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas no adheridas a la superficie del frasco de cultivo (*Figura 28*).

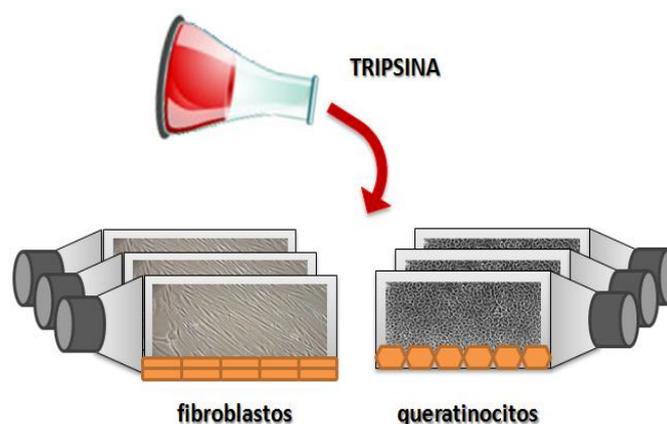


Figura 28. Proceso de tripsinización de cultivos primarios de fibroblastos y queratinocitos

Cuando las células se desprenden de la superficie de los frascos de cultivo, se procede a inactivar la tripsina mediante la unión de 2 ml de medio de cultivo específico, ya sea medio MF, útil para el cultivo de fibroblastos y células madre del tejido adiposo, o medio de queratinocitos QC, porque en ambos casos, dichos medios contienen en su composición suero bovino fetal con abundantes proteínas séricas, que serán las encargadas de inactivar la acción proteolítica de la tripsina.

Después, dicha solución inactivada en la que están las células desprendidas, se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener un *pellet* con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina (Figura 29). El *pellet* celular se resuspende cuidadosamente en 5 ml de medio MF o QC y estas células se cultivan en frascos de cultivo de 25 o 75 cm² de superficie.

En el caso de los cultivos de ADSCs, las células se subcultivaron hasta el pase 8 para el análisis de viabilidad celular que se expone en el siguiente apartado (Figura 29).

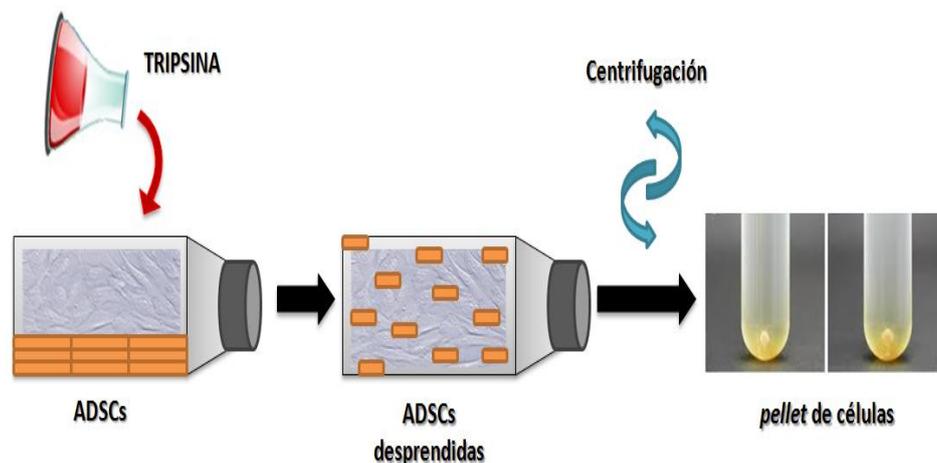


Figura 29. Proceso de obtención de subcultivos de ADSCs.

Como se ha mencionado con anterioridad todos los subcultivos se mantienen en una atmósfera a 37°C y 5% de CO₂ hasta obtener la confluencia para el siguiente pase, recambiando los medios de cultivo específicos en cada caso. (Figura 30)



Figura 30. Conservación de los distintos subcultivos celulares.

2.3. ANÁLISIS DE VIABILIDAD CELULAR EN SUBCULTIVOS SECUENCIALES DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL TEJIDO ADIPOSO

La determinación de la viabilidad celular es un marcador predictivo para la funcionalidad de los tejidos elaborados a partir de las células madre. Son varios los métodos para el estudio de la viabilidad y funcionalidad celular en el laboratorio, entre los cuales destacan: evaluación de la integridad de la membrana celular, ensayos funcionales, ensayos de viabilidad a través de biosensores de fluorescencia, ensayos morfológicos, microanálisis por energía dispersiva de rayos X y técnicas de determinación de la expresión génica mediante microarrays.

En nuestra Tesis se han realizado los estudios de viabilidad de las ADSCs siguiendo el método de la evaluación de la integridad de la membrana celular, que consiste en que si una célula está muerta o se está muriendo, la función de la membrana celular se encontrará alterada y, por un lado, puede permitir el paso de moléculas que en condiciones normales no difundirían, o bien, no permitir el paso de moléculas que en condiciones normales si la atravesarían.

Podemos distinguir tres tipos de ensayos:

- Los que emplean sustancias colorantes o fluorescentes.
- Los basados en tinciones catiónicas.
- Los basados en la liberación de determinadas sustancias al medio extracelular.

Los más utilizados son los basados en colorantes o moléculas fluorescentes, y dentro de ellos, podemos diferenciar entre ensayos de exclusión y de inclusión.

En los ensayos de exclusión, si la membrana celular está íntegra, el colorante fluorescente no es capaz de atravesarla; y si ésta está dañada, el colorante difundirá sin dificultad. Los resultados obtenidos se observan a través del microscopio o por citometría de flujo. Entre los colorantes orgánicos más utilizados para los ensayos de exclusión destaca el *azul tripán* (Hoskins, Meynell et al. 1956; Patterson 1979).

En los ensayos de inclusión se usan moléculas como el *diacetato de fluoresceína* (Rotman B 1966; Mohr LR 1980) o la *calceína* (Papadopoulos 1994). Cuando la célula está viva, estas moléculas atraviesan la membrana plasmática, se hidrolizan por las esterasas intracelulares, y dan lugar a fluorescencia en el interior de la célula. Las células no dañadas o vivas retienen fluorescencia, mientras que las células con membranas dañadas son incapaces para hacerlo y la señal es muy débil bajo el microscopio.

2.3.1 ANÁLISIS MEDIANTE ENSAYOS DE EXCLUSIÓN DE COLORANTES

VITALES

En esta Tesis Doctoral, se estudió la viabilidad de los ocho primeros subcultivos de las células ADSCs del conejo de laboratorio utilizando el método de exclusión del colorante vital azul tripán, obteniendo así la viabilidad celular de los primeros subcultivos celulares.

Durante la realización de los procedimientos necesarios para obtener cada uno de los subcultivos de las ADSCs anteriormente descritos, se toman aproximadamente 5µl de las células resuspendidas en 1 ml de medio, añadiéndose 5µl de solución *Trypan Blue*®. Posteriormente, dicha mezcla se coloca sobre una placa de Neubauer para el conteo de las células bajo el microscopio óptico y cálculo del número de células teñidas de azul -células muertas- y células no teñidas -células vivas- (Figura 31).



Figura 31. Esquema de la realización del método de viabilidad con azul tripán.

Tras el recuento de las células vivas y las muertas por cuadrante, se recogen los datos en tablas y se calcula el porcentaje de supervivencia (células vivas/células vivas + células muertas) de cada uno de los pases de cada una de las muestras obtenidas.

2.3.2 ENSAYOS MIXTOS METABÓLICOS Y DE EXCLUSIÓN DE COLORANTES VITALES FLUORESCENTES

A continuación, se realizó un estudio de viabilidad de cada pase de los cultivos de ADSCs utilizando el ensayo comercial *Live/Dead*® *kit* que contiene 2 marcadores diferentes. Por un lado, *calceína*, que es una pequeña molécula capaz de penetrar en las células que poseen la membrana plasmática intacta, reflejando la actividad de las esterasas citoplasmáticas, y

proporcionando una fluorescencia verde una vez activada por dichas esterasas; y por otro, un derivado del *bromuro de etidio*, que penetra en las células con membrana dañada (por tanto, no viables), proporcionando una fluorescencia de color rojo.

En primer lugar, se sembró cada pase celular de las células a analizar en cámaras de cultivo estériles (*chamber slide system*®) (Figura 32). Para el análisis, cada cámara fue lavada dos veces con solución salina fisiológica estéril (PBS), para añadir con posterioridad la solución del kit siguiendo las instrucciones del fabricante preparada según se detalla a continuación.

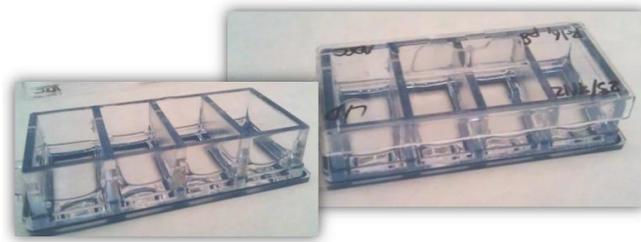


Figura 32. Frascos de cultivo celular estéril utilizados para los ensayos de viabilidad según técnica *Live/Dead*.

Para preparar la solución del Kit *Live/Dead*® se utiliza un frasco tipo Eppendorf® protegido de la luz, en donde se introduce la siguiente proporción de los componentes anteriormente mencionados: (Figura 33)

- 2,5 ml de una solución estéril de PBS
- 5µl de derivado de bromuro de etidio
- 1,25µl de solución de calceína

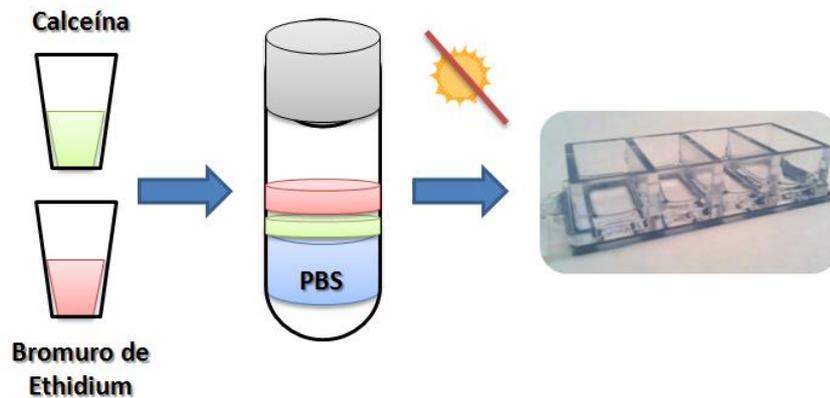


Figura 33. Esquema de preparación del Kit Live/ Dead para la realización del ensayo de fluorescencia.

Posteriormente, se añaden 500 μ l de dicha solución en cada pocillo de cultivo que contenía las células, dejándose actuar durante 5 minutos, protegiéndolo igualmente de la luz. Seguidamente, se retira el sobrante de la solución del kit de cada pocillo, se vuelve a lavar con PBS estéril, se cubren las células con cubreobjetos y se realiza el análisis de las muestras mediante el microscopio óptico de fluorescencia. Para cada cultivo, se recogieron 10 fotografías en los canales rojo y verde de fluorescencia (Figuras 40 y 41). Finalmente, se determinó el número de células vivas y muertas por imagen obtenida mediante el software NIS-Elements, recogiendo los datos en tablas de Excel para el cálculo de los porcentajes de supervivencia en cada subcultivo.

3. ELABORACIÓN DE CONSTRUCTOS TISULARES MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

Para la generación de sustitutos artificiales de la mucosa oral y el hueso palatinos, se han utilizado diferentes técnicas optimizadas con anterioridad por el grupo de investigación de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología la Universidad de Granada, que se resumen brevemente a continuación.

3.1 GENERACIÓN DE SUSTITUTOS DEL CORION DE LA MUCOSA PALATINA

En primer lugar, se fabricaron sustitutos del tejido conectivo (corion o lámina propia) de la mucosa palatina utilizando biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurados. Para su elaboración, 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) siguiendo las normas y recomendaciones de la Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT), el cual se combinó con distintos componentes según protocolos previamente optimizados por el grupo de investigación (*Meana A 1998; Llames, Del Rio et al. 2004*):

- 250.000 Fibroblastos procedentes de cultivos primarios resuspendidos en 2,35 ml medio de cultivo DMEM.
- Plasma sanguíneo humano (que contiene el fibrinógeno): 21 ml.
- Ácido tranexámico (*Amchafibrin®*): 200 µl.
- Agarosa tipo VII al 2% especial para cultivos celulares disuelta en PBS: 1,25 ml (concentración final de agarosa: 0,1%)
- CaCl₂ al 1% para precipitar la reacción de gelificación: 200 µl.

Inicialmente, los fibroblastos se resuspenden en medio de cultivo DMEM, a los que se le añade plasma sanguíneo humano. Seguidamente, a todo ello se le une ácido tranexámico como antifibrinolítico para evitar la fibrinólisis espontánea de los geles de fibrina. Al mismo tiempo, se añade la disolución de agarosa al 2% en PBS, calentando dicha mezcla hasta ebullición para favorecer la disolución de la agarosa. Finalmente, se indujo la polimerización de las fibras de fibrina en la mezcla mediante la adición de CaCl_2 , alicuotándose inmediatamente en recipientes estériles de cultivo celular y dejándose solidificar a 37°C con 5% de CO_2 durante 2 horas. A continuación, estos geles se cubrieron con medio de cultivo MF (Alaminos, Garzon et al. 2007; Sanchez-Quevedo, Alaminos et al. 2007; Garzon, Serrato et al. 2009) (Figura 34)

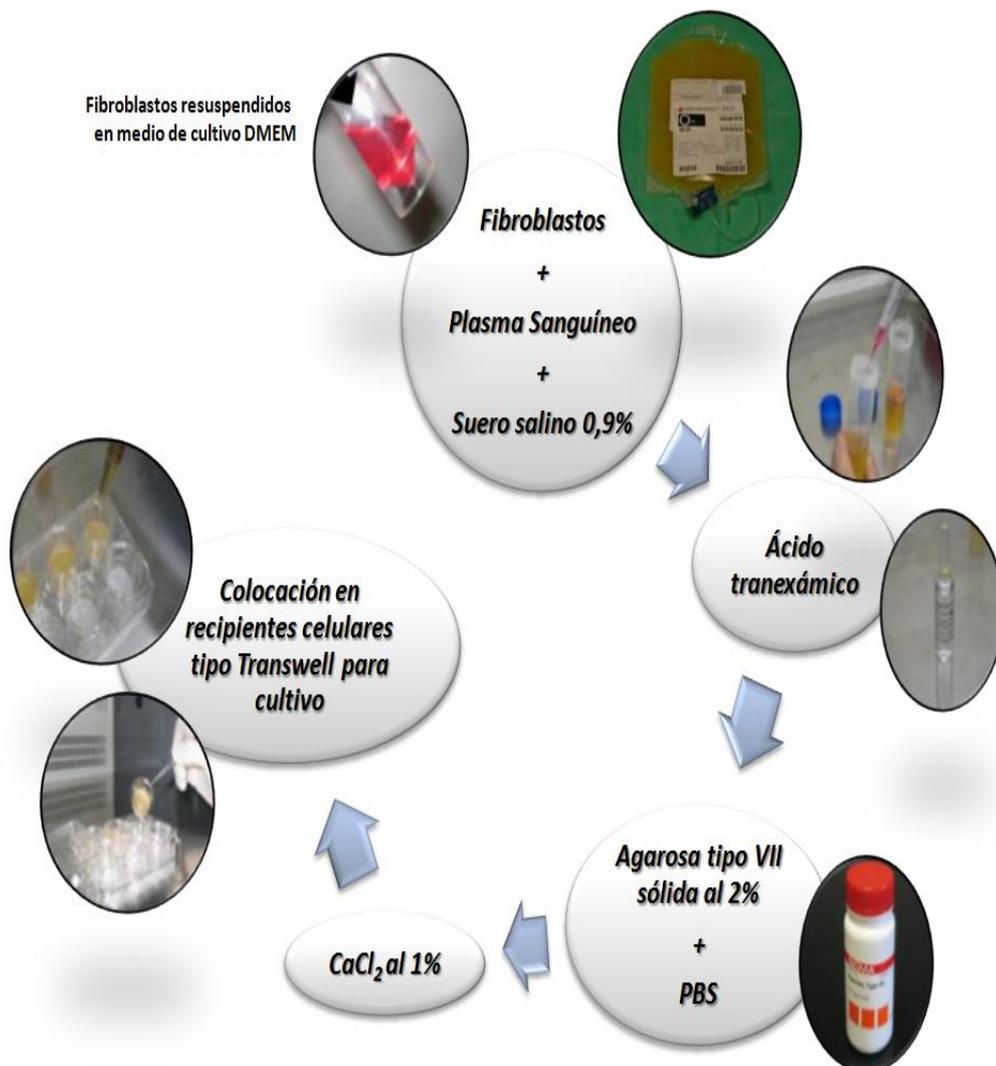


Figura 34. Esquema de preparación de sustitutos estromales de fibrina-agarosa.

3.2 CONSTRUCCIÓN DE SUSTITUTOS COMPLETOS DE MUCOSA

PALATINA

Para generar sustitutos completos de la mucosa palatina, se utilizaron los sustitutos estromales previamente generados, cultivándose un epitelio formado por queratinocitos en su superficie. Todo ello se realizó según el siguiente protocolo de cultivo secuencial:

En primer lugar, se tripsinizan los cultivos primarios de epitelio de la mucosa oral, para poder cultivar las células epiteliales individualizadas sobre las superficie de los sustitutos estromales generados en sistemas de cultivo *Transwell®* con membranas porosas de $0.4 \mu\text{m}$ (*Figura 35*) en medio QC (unas 500.000 células en cada caso).

En segundo lugar, se procede a inducir la correcta diferenciación y estratificación del epitelio mediante técnicas de cultivo en *interfase aire-líquido* (*Reichl S 2003*). Para ello, se reduce la cantidad de medio QC aplicado a los constructos de mucosa oral elaborados en sistemas *Transwell®* para dejar el epitelio en contacto directo con el aire. 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. 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. (*Figura 36*)



Figura 35. Recipientes estériles de cultivo tipo Transwell®.

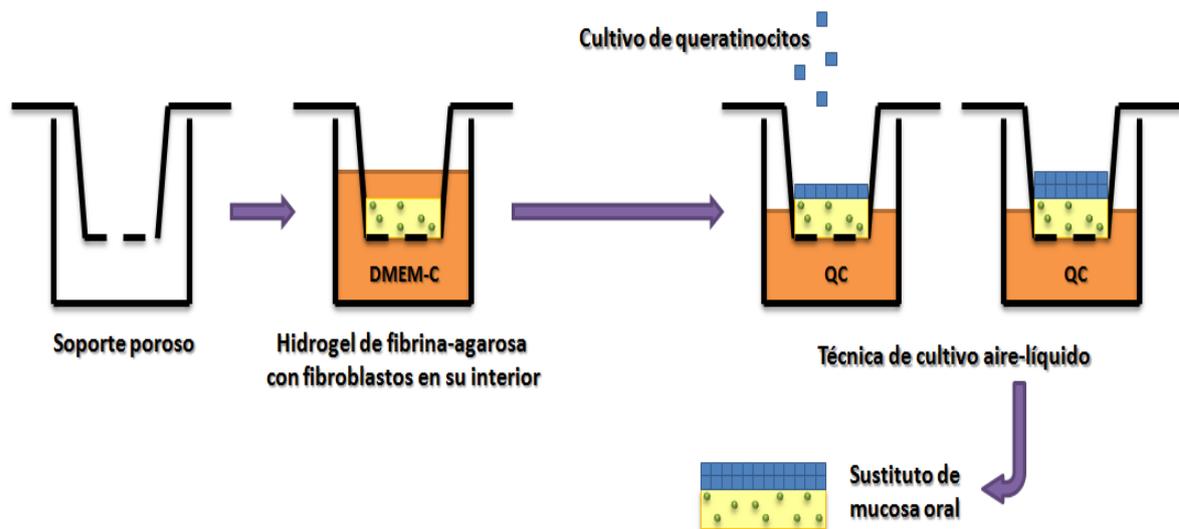


Figura 36. Esquema del proceso de elaboración de sustitutos de mucosa oral utilizando una técnica secuencial sobre sistemas de cultivo Transwell®.

Finalmente, los sustitutos completos de mucosa palatina fueron sometidos a nanoestructuración para mejorar sus propiedades biomecánicas, tal como se describe en el apartado correspondiente.

3.3 GENERACIÓN DE SUSTITUTOS DE HUESO PALATINO MEDIANTE TRANSDIFERENCIACIÓN DE ADSCs

Para la generación de sustitutos de hueso tridimensionales, se utilizan biomateriales de fibrina-agarosa en una técnica parecida a la anteriormente descrita, pero utilizando en este caso las células madre mesenquimales obtenidas del tejido adiposo (ADSCs).

Una vez que las ADSCs alcanzan un estado de subconfluencia, se tripsinizan y después, se combinan con biomateriales de fibrina-agarosa 0,1% (aproximadamente 175.000 células/ml).

Posteriormente, antes de la gelificación, los gels de fibrina-agarosa con ADSCs se alicuotan en recipientes de cultivo estériles. Cuando el hidrogel polimeriza, los constructos artificiales se cubren con medio de cultivo MF durante 24-48h, procediéndose a inducir la diferenciación osteogénica de las células ADSCs mediante la adición de medio condicionado para la diferenciación osteogénica, que se describe a continuación durante 21 días (Nieto Aguilar R 2011; Scionti, Moral et al. 2014): (Figura 37)

- DMEM como medio basal suplementado con 10% de SBF y 1% de antibióticos (100 U/ml de penicilina G y 100 mg/ml de estreptomycin y 0,25 mg/ml de anfotericina B)
- 10nM de Dexametasona
- 10nM de β -glicerol fosfato
- 50 μ M de L-ácido ascórbico

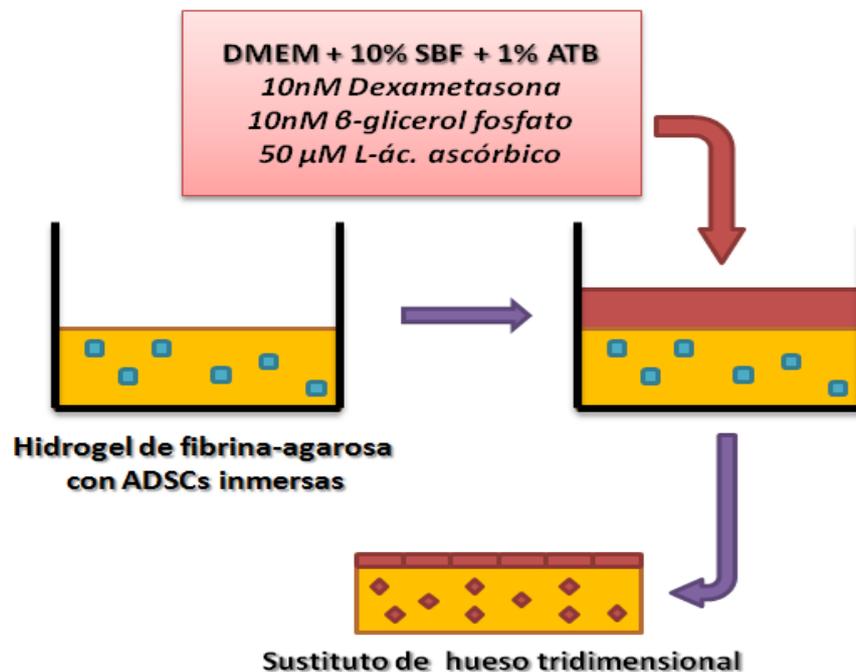


Figura 36. Esquema del proceso de elaboración del sustituto de hueso tridimensional sobre hidrogeles de fibrina-agarosa sometidos a transdiferenciación hacia linaje osteogénico.

Finalmente, estos tejidos artificiales son sometidos a nanoestructuración como se describe en el siguiente apartado.

3.4 PROCESO FINAL DE LA FORMACIÓN DE LOS CONSTRUCTOS: LA NANOESTRUCTURACIÓN

Una vez elaborados los sustitutos de mucosa y hueso palatinos, se procedió a su **nanoestructuración**, consiguiendo que el resultado final sea una estructura de resistencia suficiente para su mejor manejo, tanto en el laboratorio como a la hora de su implante en seres vivos.

Dicho proceso consta de las siguientes fases:

1. Deshidratación parcial progresiva del constructo sobre papel de filtro estéril.
2. Colocación sobre dos filtros porosos de policarbonato Millipore de 0,4 μm de diámetro de poro.
3. Aplicación de 500 g de peso sobre los filtros que contienen los tejidos artificiales en el biorreactor específico.
4. Incubación en el biorreactor durante 10 min para inducir la reacción de entrecruzamiento nanomolecular entre las fibras de fibrina y la agarosa.
5. Retirada de los filtros porosos.
6. Obtención del tejido nanoestructurado y rehidratación parcial en medio de cultivo estéril.

4. GRUPOS DE ESTUDIO PARA EVALUACIÓN *IN VIVO*

Para determinar la utilidad *in vivo* de los sustitutos de hueso y mucosa palatina, los tejidos elaborados mediante ingeniería tisular fueron implantados en conejos de laboratorio *Oryctolagus cuniculus* albinos de raza Nueva Zelanda poco después del destete del animal. Todos los tejidos palatinos se implantaron de manera autóloga, es decir, se implantan al mismo animal del que se extrajeron las muestras de mucosa oral o tejido adiposo cuando los animales tienen alrededor de 7-8 semanas.

Para generar un modelo quirúrgico de fisura palatina, a los animales de 8 semanas (tiempo en el que aún no se ha completado el desarrollo del macizo facial y palatino), se les interviene la parte derecha del paladar a nivel de los dos primeros molares, generando un defecto sólo de fibromucosa palatina o sólo de hueso palatino. Para ello, utilizamos un bisturí circular y un trépano, tras anestesia con inyección intramuscular con Fluorane, ketamina y xilacina (ajustada según peso) cubriéndose posteriormente el defecto generado con uno de los siguientes tejidos, que determinarán los distintos grupos de estudio. (Figura 38).



Figura 38. Defecto del paladar generado en animales de laboratorio para la implantación posterior de los tejidos elaborados mediante Ingeniería Tisular.

Grupos de Estudio:

- *Grupo I.* Extracción con un bisturí circular de 4 mm de diámetro de un fragmento circular de fibromucosa palatina dejando el hueso expuesto. El defecto se cubre con mucosa palatina generada mediante ingeniería tisular fijada al lecho quirúrgico con sutura reabsorbible de 5/0.
- *Grupo II.* Se levanta un colgajo de fibromucosa palatina. Una vez expuesto el paladar óseo del lado derecho, se extirpa un fragmento óseo de 4-5 mm de diámetro utilizando un trépano adaptado a una pieza de mano, respetando la mucosa nasal, creando un defecto palatino óseo de 4-5 mm. A este nivel, se implanta el sustituto óseo generado mediante ingeniería tisular. Finalmente, se cubre el implante utilizando el colgajo palatino previamente despegado del maxilar y se fija al lecho quirúrgico con sutura reabsorbible de 5/0.

Grupos Controles:

- Control Positivo (CP): Animales es donde no se genera ningún tipo de intervención.
- Control Negativo (CN): Animales en donde se genera defecto palatino que no es corregido mediante el implante de un sustituto tisular:
 - CN1: Animales en donde se genera defecto en la fibromucosa palatina y se deja el hueso palatino expuesto. El procedimiento es idéntico al realizado en el grupo I excepto en lo referente al implante del sustituto palatino.
 - CN2: Animales a los que se realiza un colgajo de fibromucosa palatina y, una vez expuesto el paladar óseo, se genera, mediante un trépano, un defecto óseo de unos 4-5mm. Tras ello no se implantará ningún tejido, tan sólo se recubre con el colgajo de fibromucosa previamente despegado. El procedimiento es idéntico al realizado en el grupo II excepto en lo referente al implante del sustituto palatino.

Tras el implante palatino, se administra analgesia en el agua de bebida, utilizándose comida en gelatina o triturada (pienso de conejo en polvo) durante las dos primeras semanas. Posteriormente, los animales se sacrificarán mediante inyección de cloruro potásico alrededor de los 6 meses tras el implante, extrayendo todo el paladar (mucoso y óseo) para análisis morfométrico e histológico. (Figura 39)

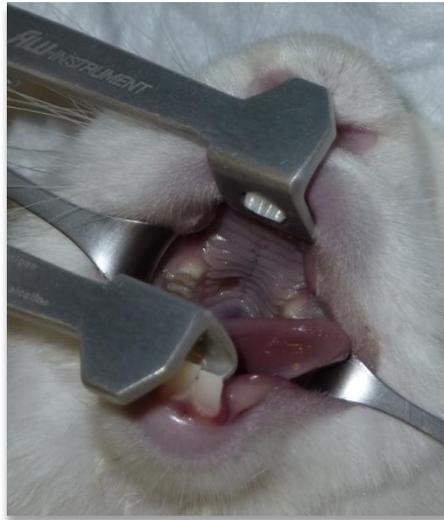


Figura 39. Imagen del paladar post-implante de tejidos elaborados en el laboratorio.

5. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Para evaluar la influencia del tejido elaborado mediante ingeniería tisular en el crecimiento y desarrollo de las estructuras palatinas tras su implante en animales de experimentación, se realizaron medidas cuantitativas de la longitud y la altura del paladar a ambos lados de la línea media (paladar intervenido y paladar control) en cada uno de los animales de estudio. De este modo, se obtuvieron mediciones entre el rafe medio del paladar y el segundo molar en el lado derecho (operado) y en el lado izquierdo (no operado) de cada animal tras el periodo de seguimiento (*Fujioka 1997*).

Para determinar el desarrollo de la mucosa palatina, se obtuvieron medidas mediante un calibre profesional. Para analizar el paladar óseo, se midió la longitud y altura del hueso palatino utilizando tanto imágenes obtenidas por TAC (tomografía computarizada) con un equipo PointNix Point 3D Combi 500C Dental Imaging System (Abex Medical System, Selangor Darul Ehsan, Malaysia). como imágenes de micro-CT con un escáner micro-CT SkyScan 1172 de alta resolución.

Todas las medidas se tomaron por triplicado, calculándose una media de las tres para mayor fiabilidad.

Para cada medida, se calcularon distancias absolutas y porcentajes de un lado del paladar respecto al otro lado.

6. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL Y HUESO *IN VIVO*

Una vez finalizado el periodo de seguimiento establecido para cada animal, se procedió a su sacrificio bajo anestesia general y a la recogida de los tejidos palatinos de interés en cada caso para análisis histológico, según se detalla a continuación.

6.1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO MEDIANTE TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

En primer lugar, los tejidos palatinos correspondientes a cada grupo de estudio (grupo I, grupo I y controles positivos y negativos) se evaluaron histológicamente mediante tinción con hematoxilina-eosina. Para ello, las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4%, tras lo cual se descalcificó el tejido óseo con reactivo de Ana Morse (ácido fórmico al 50% y citrato sódico al 20%) durante 10 días, incluyéndose posteriormente en parafina siguiendo protocolos estándar de laboratorio. Tras ello, se obtuvieron cortes de tejido de 5 micras de grosor utilizando un microtomo. Dichas secciones se tiñeron en Hematoxilina-Eosina para el estudio histológico.

En todos los casos, se determinó la estructura del tejido óseo compacto y esponjoso, de la mucosa palatina (estroma y epitelio), así como del resto de estructuras palatinas que pudiesen observarse en la muestra para determinar la presencia de signos de rechazo del injerto, hemorragia o infección, prestando especial atención a la estructura del hueso y la simetría entre el lado derecho y el izquierdo del paladar.

6.2. ANÁLISIS HISTOQUÍMICO

Para el análisis de las fibras de colágeno del hueso, las secciones de tejido se desparafinizan en xileno y se tiñen con picrosirius, analizándose con un microscopio óptico de luz polarizada.

Para detectar las glicoproteínas del hueso palatino, las secciones de tejido se tiñen con el método del ácido periódico de Schiff (PAS)

La identificación de los proteoglicanos de la matriz ósea se llevó a cabo mediante tinción con azul alción.

Para el análisis de la estructura laminar ósea y para detectar la presencia de hueso osteoide, las diferentes secciones tisulares fueron teñidas mediante azul de toluidina.

6.3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Para el análisis de componentes específicos del hueso (decorina, osteocalcina y proteína morfogenética del hueso BMP2), las diferentes secciones de tejido fueron desparafinizadas en xileno y tratadas mediante tampón citrato 0,01 M (pH6,0) a 98°C durante 5 minutos para la recuperación del antígeno. Tras ello, se aplicaron los diferentes anticuerpos primarios durante una hora a temperatura ambiente, lavándose con PBS antes de incubar con anticuerpos secundarios durante 30 minutos. Finalmente, la señal se revela con 3-3'-dianimobezidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), las muestras se contratiñen con Hematoxilina de Mayer y cada tejido se fotografía usando un microscopio Nikon Eclipse 90i.

6.4. ANÁLISIS CUANTITATIVOS

Para cuantificar los resultados de los análisis histoquímicos e inmunohistoquímicos, se utilizó el programa ImageJ (National Institutes of Health, USA) siguiendo protocolos previamente publicados por el grupo de investigación. De forma breve, cada imagen se analizó en el canal colorimétrico correspondiente a la señal deseada, procediendo a la cuantificación automática

de la intensidad de color. En cada muestra, se obtuvieron 15 mediciones de cada lado del paladar, determinándose la intensidad de la coloración histoquímica o inmunohistoquímica utilizando los mismos parámetros de balance de blancos, fondo, iluminación y contraste en todas las muestras para garantizar la fiabilidad de la medida. Tras ello, se calcularon medias y desviaciones estándar de cada marcador en cada grupo de estudio.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, se analiza la normalidad de cada distribución mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, las distribuciones normales (viabilidad celular determinada mediante la tinción azul de tripán y LIVE/DEAD®) se compararon entre dos pases celulares consecutivos con la prueba T de Student.

Los datos obtenidos en variables no normales, correspondientes a las mediciones del análisis morfométrico (longitud y altura) se compararon entre los lados derecho e izquierdo del paladar, y entre los grupos de estudio mediante la prueba exacta de Fisher.

La correlación entre los resultados obtenidos de los tejidos del paladar blando y el hueso del paladar se determinó mediante el test de correlación tau de Kedall.

Para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas para los análisis cuantitativos de la histoquímica e inmunohistoquímica entre los lados derecho e izquierdo del paladar, realizados en este trabajo, se utilizó el test U de Mann-Whitney. Además, los porcentajes de intensidad de tinción obtenidos para cada análisis (o el porcentaje de células positivas para BMP2) en el lado derecho del paladar operado se compararon con los diferentes grupos de estudio mediante el uso de la prueba exacta de Fisher.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $P < 0,05$. Sin embargo, para las comparaciones múltiples el nivel de significación ajustado por Bonferroni de 0,0014 fue el considerado como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

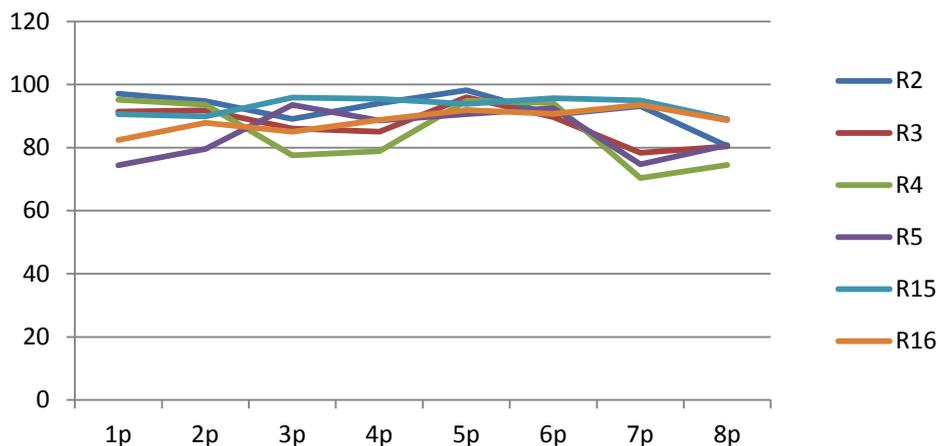
1. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR

1.1. VIABILIDAD CELULAR DETERMINADA MEDIANTE EL MÉTODO DE AZUL TRIPÁN

El análisis de viabilidad celular mediante el método de exclusión del colorante vital azul tripán reveló una elevada supervivencia media en cada subcultivo, existiendo algunas diferencias entre unos subcultivos y otros (*Tabla 2 y Gráfica 1*). En concreto, se apreció una supervivencia media superior al 82%, siendo los pases P5 y P6 los que mayor supervivencia muestran, con una diferencia estadísticamente significativa de P3 a P4 y de P6 a P7, no existiendo diferencias significativas para el resto de los pases comparados.

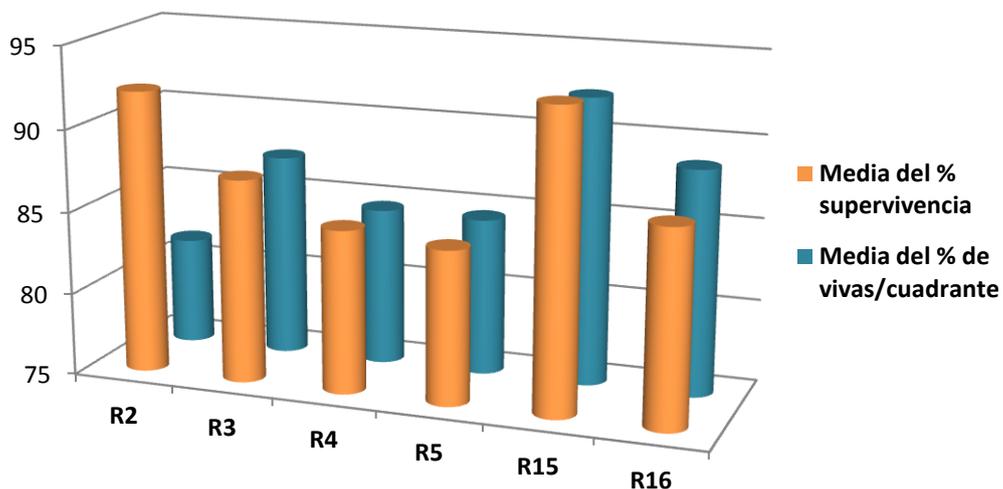
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Azul Tripán								
Media	88,94	89,09	87,88	88,33	93,83	92,18	83,79	82,26
SD	7,83	5,15	6,66	5,67	2,76	2,29	10,99	5,59
p	0,7923	0,2989	0,9986	0,0005**	0,0535	0,0001**	0,96	
	(P1vsP2)	(P2vsP3)	(P3vsP4)	(P4vsP5)	(P5vsP6)	(P6vsp7)	(P7vsP8)	

*Tabla 2. Análisis de viabilidad celular en 8 pases consecutivos (P1 a P8) de células madre del tejido adiposo (ADCs) usando el análisis por Azul Tripán. De cada pase se han calculado la media y la desviación estándar (SD). Los valores de p corresponden a la comparación estadística de dos pases consecutivos. * valores de p marginalmente significativos. ** valores de p estadísticamente significativos ajustados por Bonferroni.*



Gráfica 1. Porcentajes de supervivencia recogidos por pases.

Además, se ha realizado un análisis de las células vivas por cuadrante de cada uno de los pases comparándolo con los porcentajes de supervivencia. (Gráfica 2) Observando que los porcentajes medios de células vivas/cuadrante se encuentran todos por encima del 80%.



Gráfica 2. Comparación de los porcentajes de supervivencia totales y los porcentajes de células vivas por cuadrante.

1.2. VIABILIDAD CELULAR DETERMINADA MEDIANTE ENSAYOS MIXTOS METABÓLICOS Y DE EXCLUSIÓN DE COLORANTES VITALES FLUORESCENTES

A continuación, se realizó un estudio de viabilidad de cada pase de los cultivos de ADSCs mediante ensayos mixtos *Live/Dead*[®] (Figuras 40 y 41). Los resultados demuestran que los pases P7 y P8 presentaban los mayores niveles de viabilidad, seguidos de los pases P3 y P6. Estos resultados sugieren que éstos son los subcultivos con mayor potencialidad para la fabricación de tejido óseo palatino mediante ingeniería tisular. En la *Tabla 3* podemos observar las medias de los porcentajes de supervivencia de los pases celulares de las diferentes muestras, apreciándose diferencias significativas entre los pases P1 y P2 y entre P2 y P3.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Live/Dead[®]								
Media	93,88	94,90	97,29	94,88	95,63	97,23	98,05	97,78
SD	0,29	4,42	1,51	1,81	3,86	2,38	0,91	0,24
p	0,6993	0,0111*	0,0217*	0,6016	0,2820	0,4225	0,5914	
	(P1vsP2)	(P2vsP3)	(P3vsP4)	(P4vsP5)	(P5vsP6)	(P6vsp7)	(P7vsP8)	

*Tabla 3. Análisis de viabilidad celular en 8 pases consecutivos (P1 a P8) de células madre del tejido adiposo (ADCs) usando el análisis por Live/ Dead[®]. De cada pase se han calculado la Media y la desviación estandar (SD). Los valores de p corresponden a la comparación estadística de dos pases consecutivos. * valores de p marginalmente significativos. ** valores de p estadísticamente significativos ajustados por Bonferroni.*

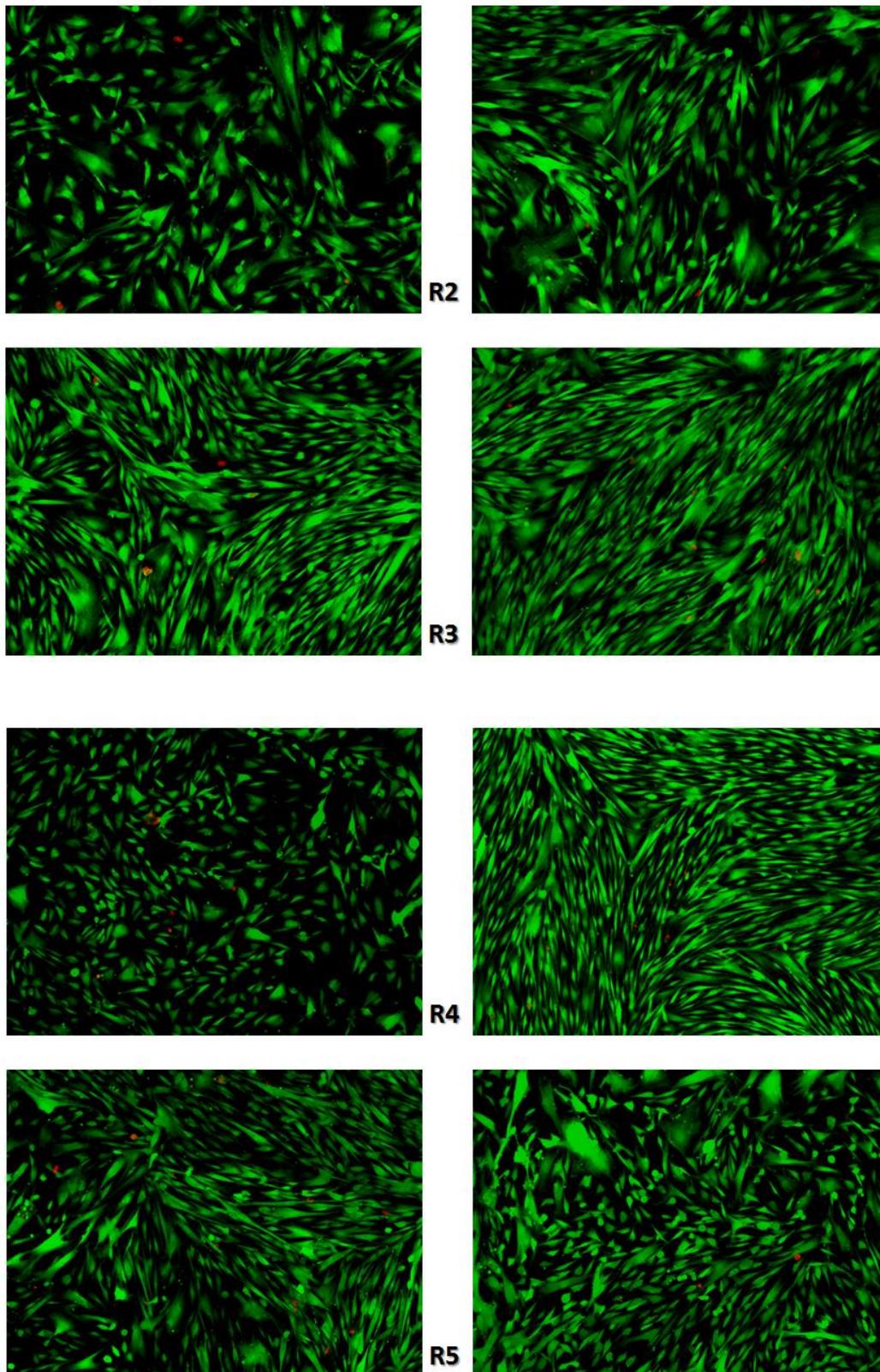


Figura 40. Muestras de subcultivos observadas con el microscopio de fluorescencia tras la tinción con el kit Live/Dead®. Las células rojas son células muertas, mientras que la verdes corresponden a células viables.

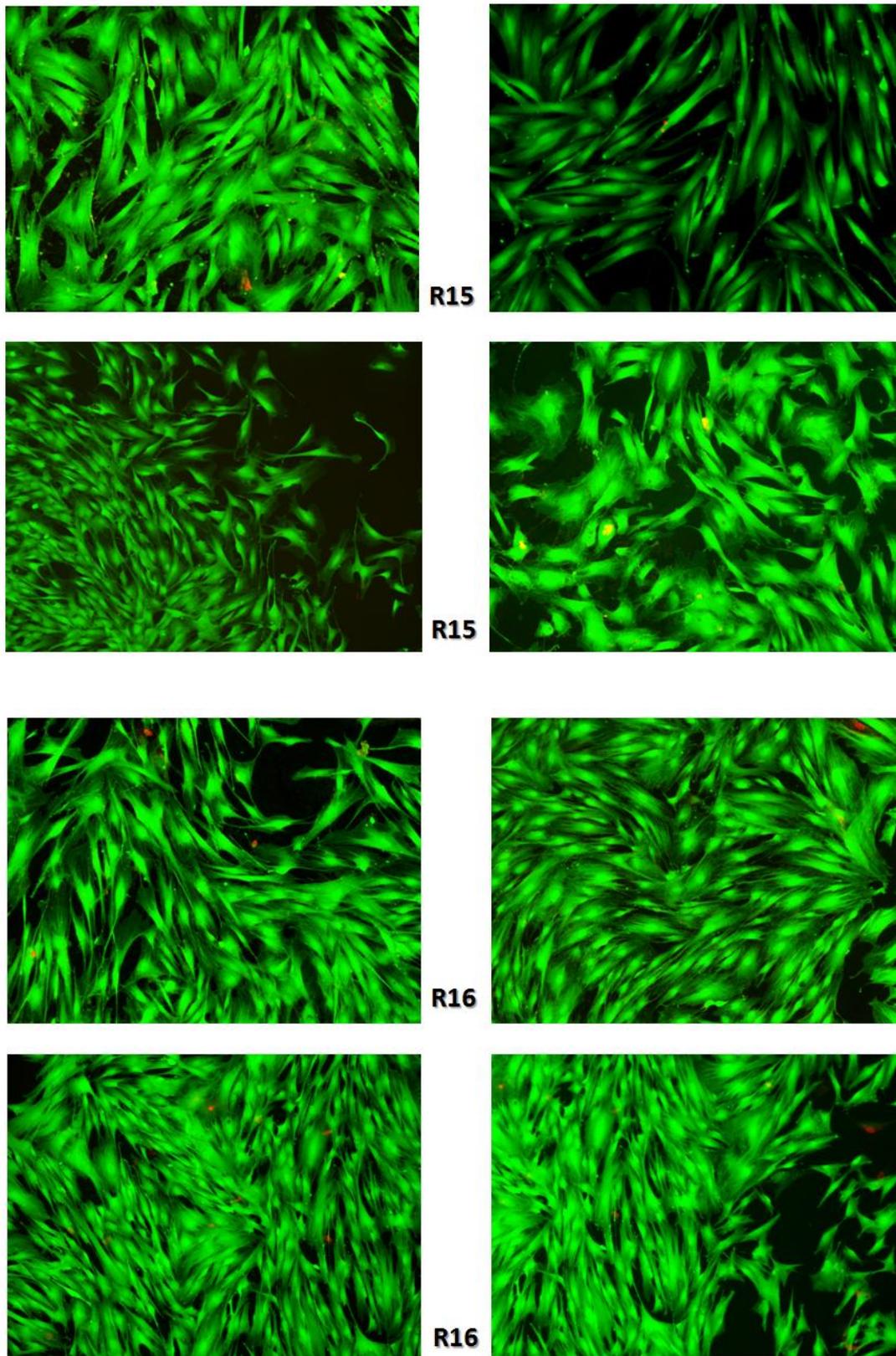


Figura 41. Muestras de subcultivos observadas con el microscopio de fluorescencia tras la tinción con el kit Live/Dead®. Las células rojas son células muertas, mientras que la verdes corresponden a células viables.

2. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL PALADAR DE ANIMALES SOMETIDOS A INJERTO DE SUSTITUTOS PALATINOS

2.1 ANÁLISIS DE ANIMALES CON INJERTOS DE SUSTITUTOS DE MUCOSA PALATINA (GRUPO I)

Inicialmente, realizamos el análisis morfométrico del paladar de los animales incluidos en el **grupo I**, en donde, tras realizar un defecto en la fibromucosa del paladar del animal de experimentación, se implantó un sustituto de mucosa palatina elaborada mediante Ingeniería Tisular. Este análisis inicial nos permite determinar la influencia en el crecimiento del paladar óseo que tiene el implante de tejido frente a los animales control.

Como se muestra en la *Tabla 3* y en la *Figura 42*, el análisis morfológico de la mucosa del paladar de los animales del grupo CP mostró muy pocas diferencias entre los lados derecho e izquierdo del paladar. En contraste, los animales del grupo CN1, en los que no se reparó el defecto de mucosa, mostraron un lado derecho significativamente más corto que el lado control izquierdo ($p < 0,0001$), y el lado operado mostró una longitud equivalente al 83,2% del tamaño del lado control no intervenido. Las diferencias entre CP y CN fueron estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). Sin embargo, cuando se utilizó el implante completo de mucosa del paladar (animales del grupo I), no existieron diferencias entre ambos lados del paladar ($p > 0,05$), y comparado con los grupos control, se encontró una diferencia significativa con el grupo CN1 ($p = 0,0004$), pero similar al grupo CP ($p > 0,05$).

Posteriormente, realizamos mediciones del hueso del paladar mediante TAC (*Tabla 3* y *Figura 42*), encontrando una correlación positiva significativa con los resultados obtenidos para la mucosa oral del paladar ($p = 0,0039$ y $r = 0,6363$ para la prueba de correlación). De manera similar, las diferencias entre ambos lados del hueso del paladar no fueron estadísticamente

significativas para el grupo CP ($p > 0,05$), mientras que el análisis de los animales del grupo CN1 reveló la existencia de diferencias significativas entre ambos lados del paladar ($p < 0,0001$), con el lado operado, que presentaba el 80,8% de la longitud del lado control. Las diferencias entre CP y CN1 para el hueso del paladar fueron también estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). En las mediciones del grupo I se encontraron muy pocas diferencias entre ambos lados del paladar ($p > 0,05$), mostrando diferencias significativas con CN1 ($p = 0,0004$), pero no con el grupo CP ($p > 0,05$).

	MUCOSA PALADAR				PALADAR ÓSEO (TAC)			
	LI	LD	%LD	Valor P	LI	LD	%LD	Valor P
CP	50,1	49,9	99,6	P=0,9999	49,7	50,3	101,2	P=0,9999
CN1	54,6	45,4	83,2	P<0,0001*	55,3	44,7	80,8	P<0,0001*
Grupo I	50,6	49,4	97,6	P=0,4974	50,7	49,3	97,2	P=0,2462
CPvsCN1	P<0,0001*				P<0,0001*			
CP vs Grupo I	P=0,4975				P=0,6212			
CN1 vs Grupo I	P=0,0004*				P=0,0004*			

Tabla 3. Análisis morfométrico de los tejidos del paladar, mucosa del paladar y hueso palatino, correspondientes a los diferentes grupos de estudio. LI: porcentaje de la longitud del paladar del lado izquierdo. LD: porcentaje de la longitud del paladar del lado derecho. %LD: porcentaje de la longitud del lado derecho en comparación con el lado izquierdo. Valor P: Comparación estadística de las medidas del lado derecho vs el izquierdo determinada por el test exacto de Fisher. CP: Control positivo; CN1: Control negativo 1.

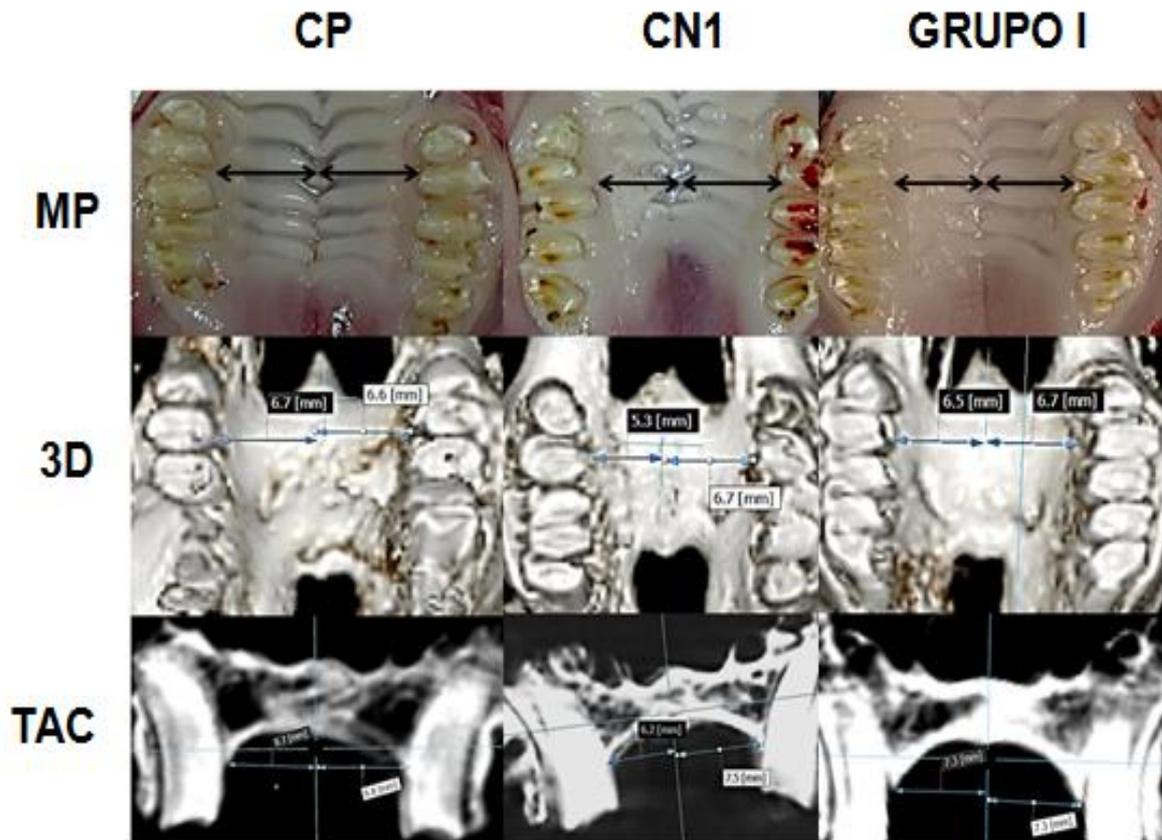


Figura 42. Análisis morfométrico de la mucosa del paladar y el crecimiento óseo de los diferentes grupos de estudio. CP: controles positivos. CN: controles negativos. Grupo I. MP: mucosa palatina. La longitud de los lados derecho e izquierdo se representa mediante flechas.

2.2. ANÁLISIS DE ANIMALES CON INJERTOS DE SUSTITUTOS DE HUESO PALATINO (GRUPO II)

Como se muestra en la *Tabla 4* y la *Gráfica 3*, el análisis morfométrico de los tejidos del paladar blando (mucosa palatina) correspondiente a los animales del grupo CP mostró que la distancia desde el rafe palatino medio a los segundos dientes molares fue muy similar en los lados derecho e izquierdo en el plano transversal (*Figura 43*). Por el contrario, los conejos del grupo CN2 mostraron que el lado operado del velo del paladar era más corto que el lado no operado (lado control), con una diferencia de longitud de más de 20% entre ambos lados,

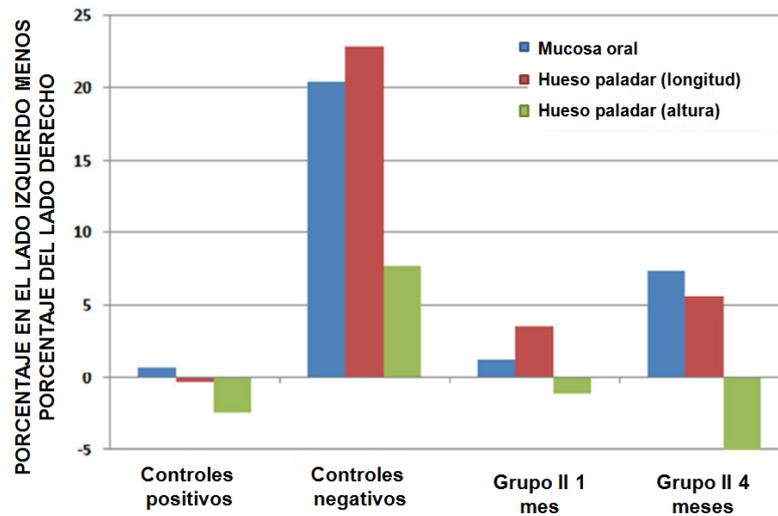
siendo significativamente diferente a los controles positivos CP. Los animales correspondientes al grupo II mostraron pocas diferencias entre el lado operado y el lado control del paladar blando y fueron significativamente diferentes a los CN2. No se encontraron diferencias significativas entre los animales del grupo II analizados tras 1 mes de evolución y animales del grupo II con 4 meses de evolución.

Al igual que ocurría en el grupo I, el análisis morfométrico de los tejidos de paladar duro (hueso del paladar) de los animales del grupo II mostró gran correlación con los datos obtenidos para los tejidos blandos (mucosa palatina) ($p = 0,00001$ y $r = 0,96969$ para la prueba de Kendall *tau*) (Tabla 5). Para estos grupos de estudio, no se encontraron diferencias significativas entre CP y CN2, y entre CN2 y los animales del grupo II con hueso injertado (Tabla 4 y Gráfica 3). Como se muestra en la Figura 44, la TAC de los animales del grupo II muestra muy pocas diferencias entre el lado control y el lado operado del paladar duro, mientras que se encontró una mala alineación de la sutura central del paladar duro en los CN2. La cuantificación de la altura del hueso en el plano coronal mostró que las diferencias entre el derecho y el lado izquierdo eran pequeñas en todos los grupos de estudio, aunque el análisis tomográfico de animales del grupo II tendió a mostrar una distribución más regular del hueso cortical y esponjoso en comparación con el los controles negativos (Figura 44). Los resultados obtenidos para las medidas de TAC tendían a correlacionar con los datos obtenidos para los tejidos blandos ($p = 0.00916$ y $r = 0,57575$) y para los tejidos duros ($p = 0.00608$ y $r = 0.60606$) en el plano transversal, aunque la significación estadística no se alcanza cuando se considera el valor de p corregida por Bonferroni (Tabla 5).

Los resultados obtenidos con la reconstrucción 3D de los animales de los grupos CN2 y grupo II, muestran una estructura más simétrica del paladar duro en animales del grupo II que en los CN2. Mientras los animales del grupo CN2 presentaron clara asimetría entre ambos lados del paladar, los animales del grupo II evaluados a los 4 meses tenían un paladar normal, con longitud y área comparables en ambos lados del paladar.

		MUCOSA ORAL		HUESO PALADAR (LONGITUD)		HUESO PALADAR (ALTURA)	
		D	I	D	I	R	I
CP		49,65±0,15	50,35±0,15	50,15±0,41	49,85±0,32	51,22±0,02	48,78±0,15
CN2		39,78±0,15	60,22±0,15	38,57±1,74	61,43±1,50	46,15±0,15	53,85±0,15
Grupo II 1 mes		49,36±0,19	50,64±0,43	48,21±0,44	51,79±0,36	50,55±0,24	49,45±0,25
Grupo II 4 mes		46,34±0,47	53,66±0,62	47,21±0,52	52,79±0,23	52,51±1,12	47,49±1,03
p valor	CPvsCN2	0,00001**		0,00000**		0,10055	
	CPvs Grupo II 1 mes	0,99999		0,12124		0,99999	
	CPvs Grupo II 4 meses	0,02786*		0,02893*		0,44475	
	CN2vs Grupo II 1 mes	0,00000**		0,0011**		0,56792	
	CN2vs Grupo II 4 meses	0,00720		0,00102**		0,56793	
	Grupo II 1 mes vs Grupo II 4 meses	0,06486		0,74753		0,21165	

Tabla 4. Análisis morfométrico de los tejidos blandos (mucosa palatina) y duros (longitud y altura del hueso palatino) de los controles y el hueso generado por bioingeniería al mes y a los 4 meses del injerto. Para cada medida, se determinan los porcentajes de distancia (longitud y altura) correspondiente del lado derecho (operado) e izquierdo (no operado). Las mediciones se muestran con media±DS. El valor de p corresponde a la comparación estadística entre grupos, usando el test exacto de Fisher. En cada caso, el porcentaje correspondiente del lado derecho de un grupo se compara con el porcentaje del lado derecho de otro grupo. CP: control positivo; CN2: control negativo 2; *valores de p significativos. ** valores de p significativos ajustados por Bonferroni.



Gráfica 3. Histograma que representa las diferencias encontradas entre los lados derecho e izquierdo de cada grupo de estudio y para la mucosa oral y el hueso del paladar (longitud y altura). Todos los valores son la diferencia de porcentaje entre el lado izquierdo y el derecho.

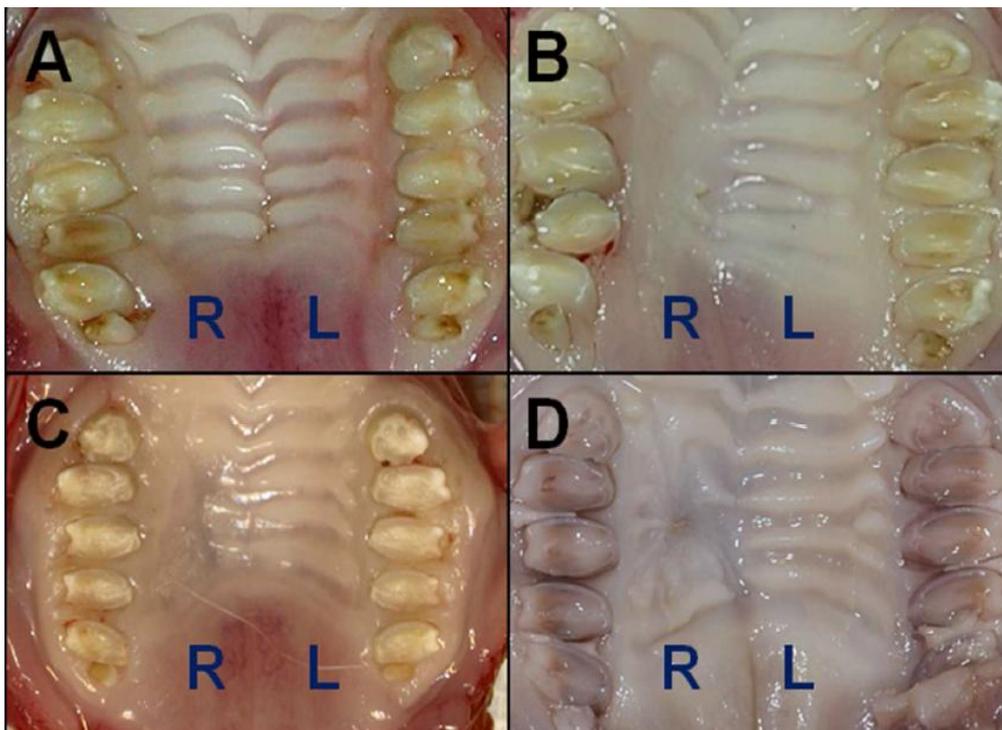


Figura 43. Apariencia macroscópica de los tejidos blandos del paladar correspondiente a cada grupo de estudio. (A) CP; (B) CN2; (C) animales con un sustituto de hueso palatino implantado (grupo II) tras 1 mes del implante; (D) animales con un sustituto de hueso palatino implantado (grupo II) tras 4 meses del implante. Todas las imágenes corresponden a una visión central del paladar, lado derecho operado (R) y lado izquierdo no operado (L).

	PALADAR MUCOSA ORAL	PALADAR ÓSEO	TAC
PALADAR MUCOSA ORAL	-	p=0,00001 r=0,96969	p=0,00916 r=0,57575
PALADAR ÓSEO	p=0,00001 r=0,96969	-	p=0,00608 r=0,60606
TAC	p=0,00916 r=0,57575	p=0,00608 r=0,60606	-

Tabla 5. Correlación entre los diferentes parámetros analizados en el análisis morfométrico llevado a cabo usando el test correlacional tau de Kendall.

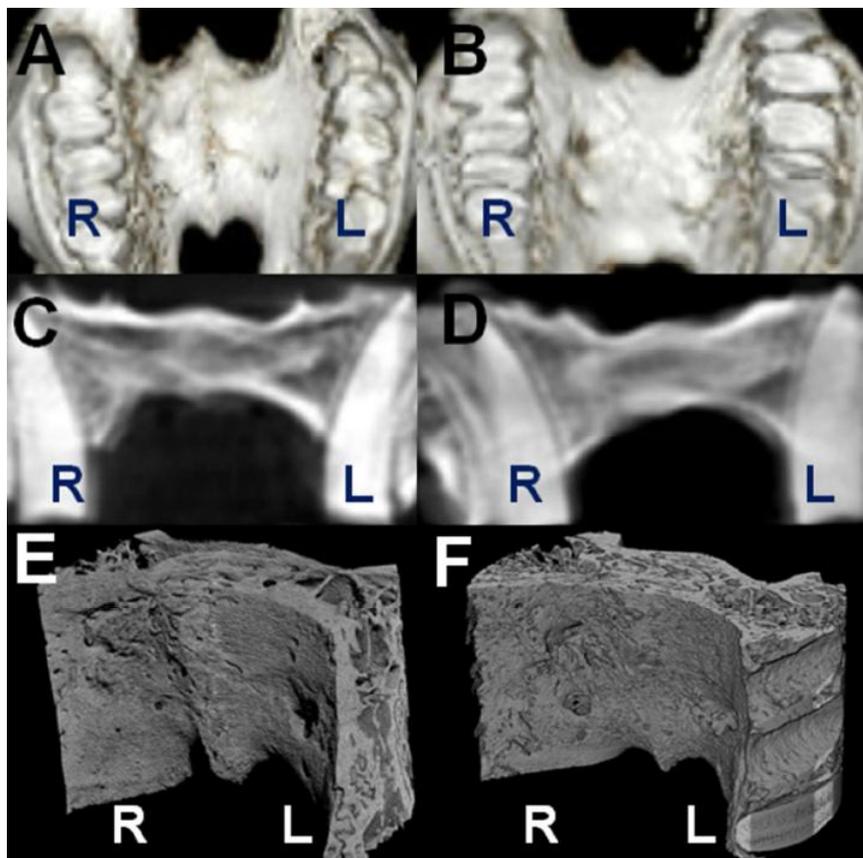


Figura 44. Imagen TAC (reconstrucción 3D), tomografía e imágenes de micro-TAC del paladar duro de los animales del grupo CN2 y animales con un sustituto de hueso palatino implantado (grupo II) de 4 meses de seguimiento. (A) TAC con reconstrucción 3D de CN2; (B) TAC con reconstrucción 3D de animales del grupo II a los 4 meses tras implante; (C) tomografía coronal de un animal del CN2 a los 4 meses; (D) tomografía coronal de un animal del grupo II a los 4 meses; (E) micro-TAC 3D de animal del CN2 a los 4 meses del implante; (F) micro-TAC 3D de animal del grupo II a los 4 meses del implante.

3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS SUSTITUTOS DE MUCOSA ORAL Y HUESO DEL PALADAR

3.1. ANÁLISIS DE ANIMALES CON INJERTO DE SUSTITUTOS DE MUCOSA PALATINA (GRUPO I)

El análisis histológico mediante hematoxilina-eosina del hueso palatino correspondiente a las diferentes muestras tisulares de los animales del grupo I y los controles CP y CN1 reveló muy pocas diferencias entre los diferentes grupos de estudio (*Figura 45*). Sin embargo, el análisis histológico del sustituto completo de mucosa oral generado *in vitro*, previamente a su implante, mostró una capa estromal fibrilar con numerosos fibroblastos inmersos en su interior y una capa superficial bien estructurada con 2-3 capas de células de queratinocitos. Una vez implantada *in vivo*, la mucosa oral correspondiente al lado operado mostró varias diferencias entre los grupos. En primer lugar, los CP mostraron las crestas epiteliales típicas y las papilas coriales en la unión del estroma con el epitelio, con más de 20 capas de células en algunas regiones del epitelio. En contraste, la mucosa oral correspondiente a los CN1 había perdido las crestas epidérmicas y las papilas coriales, y la unión era muy plana, con un menor número de capas de queratinocitos. Por último, la mucosa oral en las muestras de los animales del grupo I se parecía altamente a la estructura de la mucosa de los CP, con crestas epidérmicas bien estructuradas, papilas coriales y un gran número de capas de células epiteliales.

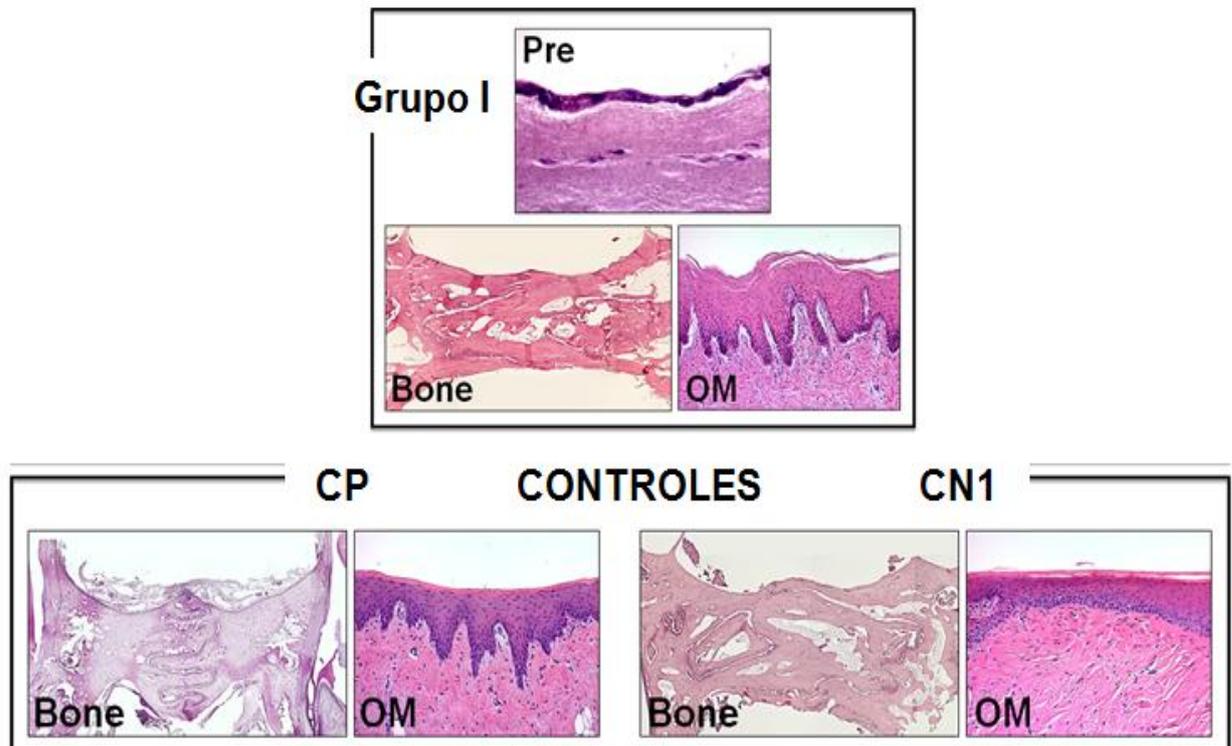


Figura 45. Análisis histológico de la mucosa del paladar y el hueso teñidos con hematoxilina-eosina. Para cada grupo se muestran el hueso y la mucosa oral. CP: controles positivos; CN: controles negativos del grupo I (CN1); Grupo I: animales con sustituto de mucosa palatina implantado. OM: mucosa oral. Bone: Hueso. Pre: aspecto del tejido artificial antes del implante in vivo.

Sin embargo, cuando se analizó la matriz extracelular del hueso palatino mediante histoquímica e inmunohistoquímica, encontramos algunas diferencias entre las muestras.

En primer lugar, la detección de las fibras de colágeno mediante la tinción con picosirius y visualización mediante microscopio de luz polarizada (Figura 46) mostró que las fibras de colágeno estaban orientadas correctamente y mostraron una alta compactación en el lado no operado (izquierdo) del paladar de todos los animales. En contraste, el lado operado (derecho) correspondiente a CN1 mostró menor cantidad de fibras y menor compactación, con una estructura fibrilar más heterogénea en el lado derecho y una estructura más homogénea en el lado izquierdo. Las diferencias entre los animales CN1 y los CP o los animales del grupo I fueron estadísticamente significativas (Tabla 6). Del mismo modo, el análisis cuantitativo de la

intensidad de tinción de fibras de colágeno mostró diferencias significativas entre el lado derecho y el lado izquierdo del paladar óseo sólo para CN2, pero no para los CP, y además la intensidad de la tinción del lado operado de los animales del grupo I fue similar a la de los animales del grupo CP (Tabla 6).

Cuando se analizó la concentración de decorina, encontramos cantidades muy bajas de esta molécula en todas las muestras, sin diferencias entre los lados derecho e izquierdo de cualquiera de los grupos (Figura 46 y la Tabla 6). Comparaciones bilaterales entre grupos mostraron diferencias significativas entre los animales del grupo I y los otros grupos control, CP y CN1.

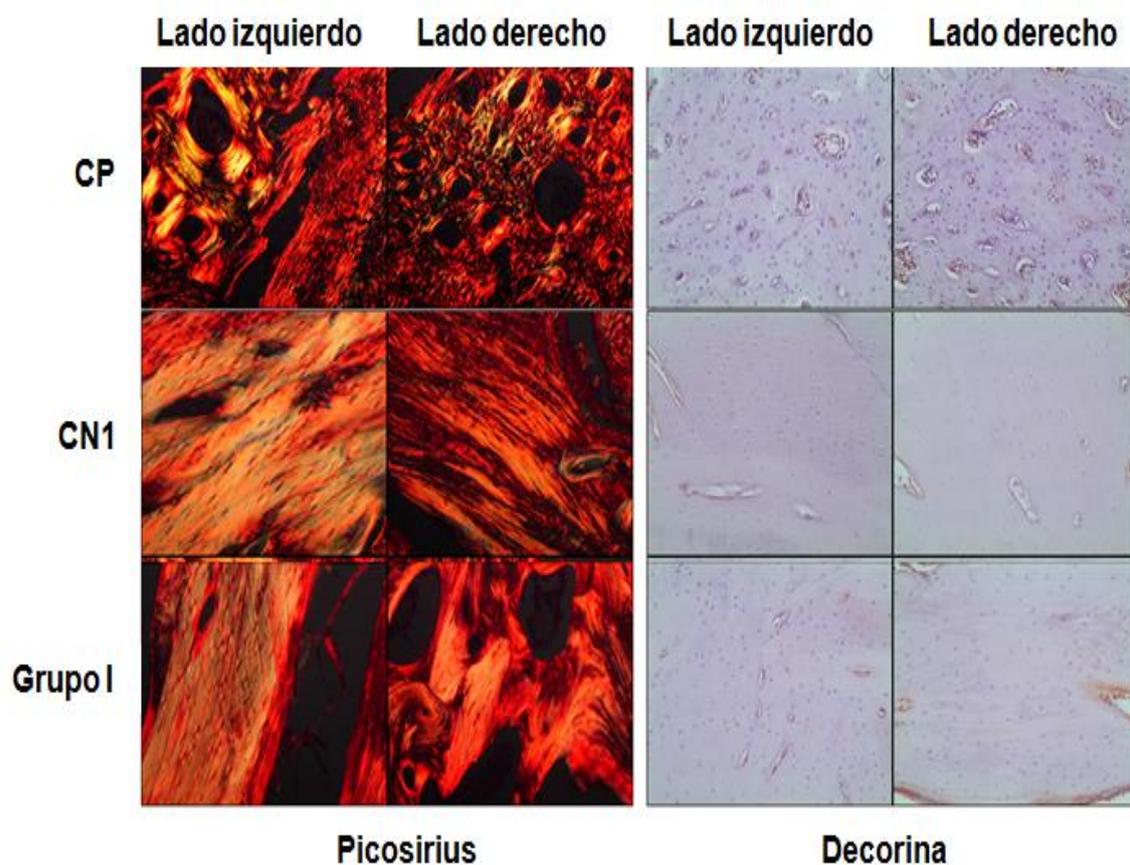


Figura 46. El análisis histológico de las fibras de colágeno y de la concentración de decorina en la médula paladar de los controles positivos (CP), controles negativos (CN1), y el grupo I de animales con implante de mucosa oral generada por bioingeniería, mediante tinción con luz polarizada picosirius e inmunohistoquímica, respectivamente. Para cada grupo, se muestran imágenes del lado derecho e izquierdo del paladar.

El análisis con Azul Alcían del contenido de proteoglicanos en la matriz extracelular ósea mostró que la presencia de estos componentes también varió entre los diferentes grupos de estudio (*Figura 47 y Tabla 6*). Así, el análisis de las muestras de los CP la presencia de estos componentes de la matriz extracelular (MEC) a nivel pericelular y extracelular, sin diferencias significativas en la intensidad de la tinción entre el lado derecho y el izquierdo. Sin embargo, se detectó una mayor presencia de estos componentes no fibrilares en el lado derecho (el lado operado) del hueso palatino de los CN1 en comparación con el lado de control izquierdo de los mismos animales, existiendo diferencias estadísticamente significativas con los CP y los animales del grupo I. Los proteoglicanos se observaron con alta intensidad en la matriz extracelular del tejido óseo en el lado de la lesión, mientras que estos componentes tendieron a ser pericelulares en el lado izquierdo de control de estos animales. Finalmente, las muestras del grupo I mostraron una presencia homogénea de proteoglicanos en ambos lados del paladar óseo, sin diferencias estadísticamente significativas entre los lados y con los CP. Además, el patrón de expresión de estos componentes de la MEC era principalmente pericelular, y no extracelular.

El análisis de glicoproteínas del hueso determinado por PAS (*Figura 47 y Tabla 6*) reveló una distribución homogénea entre ambos lados del paladar en los CP y el grupo I, pero un mayor contenido de glicoproteínas en el lado derecho operado de los CN1. Las diferencias entre ambos lados del paladar fueron estadísticamente significativas. Curiosamente, la presencia de glicoproteínas en el grupo I fue estadísticamente similar al grupo de CP y diferente al grupo de CN1.

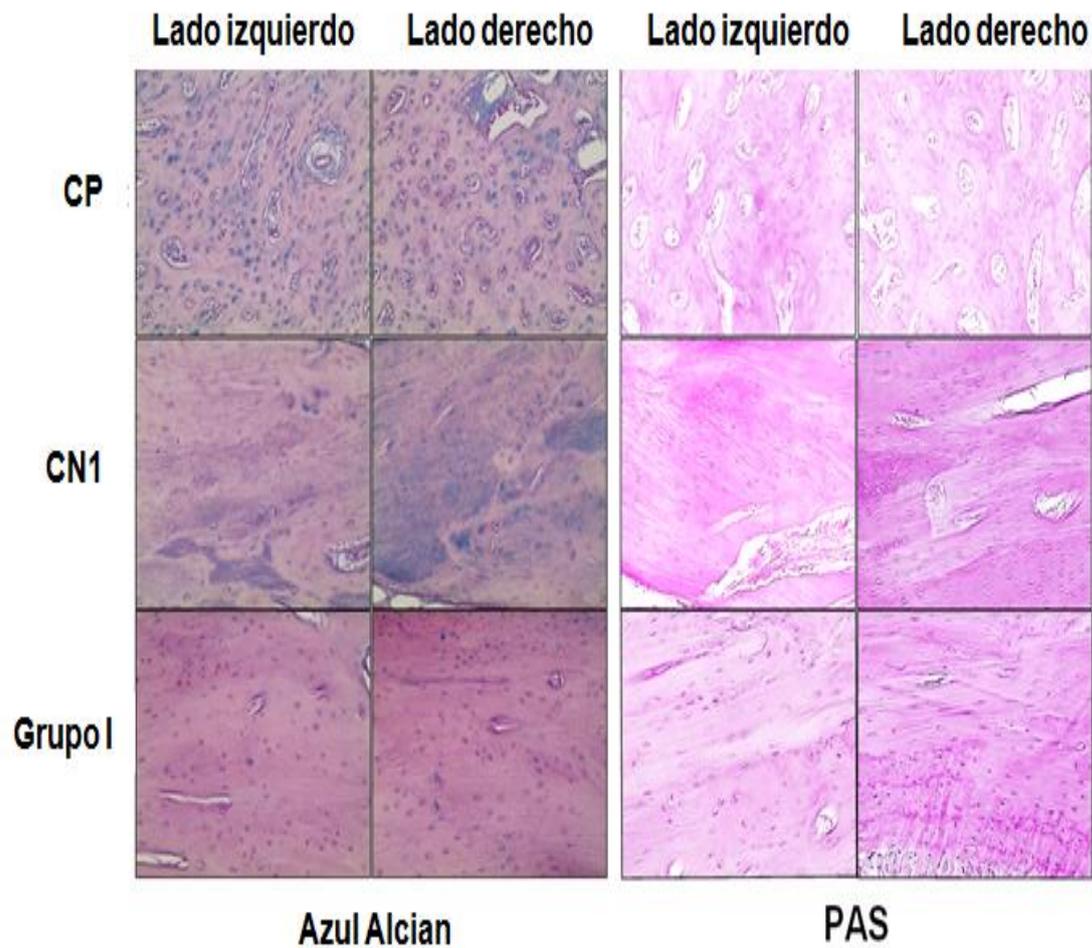


Figura 47. El análisis histológico de los proteoglicanos y las glicoproteínas del paladar óseo de los diferentes grupos de estudio: controles positivos (CP), controles negativos (CN1), y el grupo I de animales con implante de mucosa oral generada por bioingeniería (MOB), mediante tinción con azul Alcian y PAS, respectivamente. Para cada grupo, se muestran imágenes correspondientes a ambos lados del paladar.

Por último, el análisis de los marcadores óseos osteocalcina y BMP2 reveló que la presencia de BMP2 se restringió a la población de células osteocíticas, mientras que la osteocalcina fue extracelular. La comparación entre los lados derecho e izquierdo del hueso palatino mostró que la expresión de ambos componentes se distribuyó de manera similar en ambos lados del paladar, con diferencias no significativas entre los lados en todos los grupos de estudio (Figura 48 y la Tabla 6). Además, no se encontraron diferencias entre los grupos de estudio para BMP2 ni para osteocalcina.

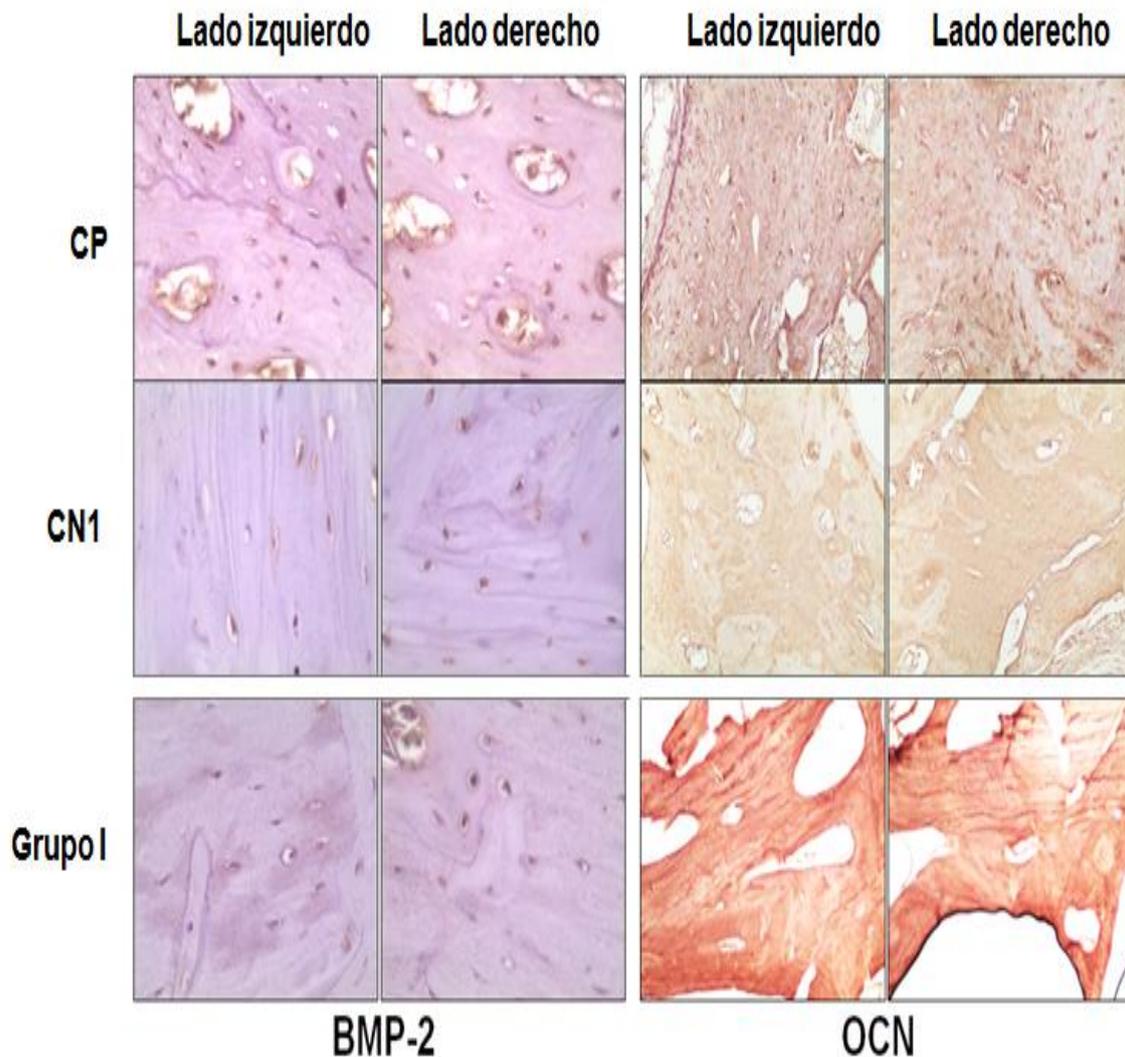


Figura 48. El análisis histológico de la BMP2 y la osteocalcina en los grupos de estudio: controles positivos (CP), controles negativos (CN1) y el grupo I de animales con implante de mucosa oral generada por bioingeniería, mediante inmunohistoquímica. La BMP2 es intracelular, mientras que la osteocalcina (OCN) está presente en la matriz extracelular del hueso paladar. Para cada grupo se muestran imágenes correspondientes a la parte de control izquierda y al lado derecho del paladar.

		PICROSIRIUS		DECORINA		AZUL ALCIÁN		PAS		OSTEOCALCINA		BMP2	
		Intensidad	D vs I	Intensidad	D vs I	Intensidad	D vs I	Intensidad	D vs I	Intensidad	D vs I	Intensidad	D vs I
CP	<i>Izqda.</i>	187.9±20.5	P=0.1053	60.1±2.8	P=0.3589	72.4±9.0	P=0.7563	19.1±4.0	P=0.1664	41.4±9.8	P=0.1961	60.5±8.1	P=0.1299
	<i>Drcha</i>	202.8±27.5		68.7±6.9		73.3±7.2		15.7±3.5		47.6±15.2		58.0±5.5	
CN1	<i>Izqda.</i>	193.8±27.4	P<0.0001	69.2±4.4	P=0.0714	83.8±11.8	P=0.0003*	19.7±8.7	P<0.0001*	38.0±10.2	P=0.6293	65.3±6.5	P=0.1552
	<i>Drcha</i>	117.8±23.7	*	62.9±4.4		103.0±12.8		47.6±15.6		36.2±9.8		67.3±8.0	
Grupo I	<i>Izqda.</i>	171.4±37.0	P=0.3519	58.9±3.6	P=0.7226	87.4±9.1	P=0.0926	23.0±7.6	P=0.7289	99.3±35.9	P=0.6509	55.6±10.5	P=0.0715
	<i>Drcha</i>	160.8±22.3		59.4±3.5		93.0±8.7		26.0±6.8		104.0±16.1		60.0±9.0	
CP vs. CN1		P<0.0001*		P=0.4989		P<0.0001*		P<0.0001*		P=0.0813		P=0.9999	
CP vs. Grupo I		P=0.9999		P=0.0013*		P=0.1184		P=0.9999		P=0.0813		P=0.5371	
CN1 vs. Grupo I		P<0.0001*		P=0.0185*		P=0.0092*		P<0.0001*		P=0.9999		P=0.3311	

Tabla 6. El análisis cuantitativo de colágeno, proteoglicanos, decorina, osteocalcina, glicoproteínas y BMP2 en los controles positivos (CP), controles negativos (CN1), y el grupo I con implante de mucosa oral, determinados por histoquímica o inmunohistoquímica. Todos los resultados corresponden a un promedio de valores de intensidad ± desviación estándar determinado por el software ImageJ, a excepción de la BMP2, que se expresa como porcentaje de células positivas por área de tejido ± desviación estándar.

3.2 ANÁLISIS DE ANIMALES CON INJERTOS DE SUSTITUTOS DE HUESO PALATINO (GRUPO II)

En primer lugar, se analizaron los tejidos palatinos correspondientes a los diferentes controles CP y CN2, así como a los animales del **grupo de estudio II** utilizando tinciones histológicas de hematoxilina-eosina. De este modo, se pudo observar que, a diferencia de los CP, la estructura del hueso palatino correspondiente a los CN2 presentaba diferencias histológicas entre los lados derecho e izquierdo, con una estructura de hueso desorganizado y con alta densidad ósea en la zona del procedimiento quirúrgico, y un hueso bien estructurado en el lado no intervenido (*Figura 49*). Sin embargo, las muestras correspondientes a animales del grupo II eran más simétricas, con un tejido bien organizado en la zona de implante, siendo este resultado similar a los CP. Las diferencias entre los lados derecho e izquierdo no eran evidentes en los animales del grupo I ni al mes ni a los 4 meses de evolución.

En segundo lugar, se analizaron distintos componentes del hueso palatino mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, obteniéndose los siguientes resultados:

Cuando se analizó la distribución de colágeno en cada animal mediante picosirius polarizado, se encontró un patrón regular de alineación de colágeno en todos los animales, incluyendo los CP y CN2 y los animales del grupo II.

Posteriormente, se analizó mediante inmunohistoquímica la expresión de osteocalcina (*Figura 50*), encontrando que la distribución de este marcador óseo era homogénea y preferentemente restringida a zonas de lagunas pericelulares de osteocitos y a los límites de las láminas de hueso en los CP. En contraste, el análisis de los CN2 mostró una expresión pericelular de la osteocalcina, con poca expresión en la matriz extracelular ósea. El grupo II de animales mostró expresión de osteocalcina tanto pericelular como extracelular, aunque la distribución de este marcador tendía a ser más intensa en los límites de las laminas solamente en los animales de 4 meses, siendo más irregular en los animales de 1 mes de evolución.

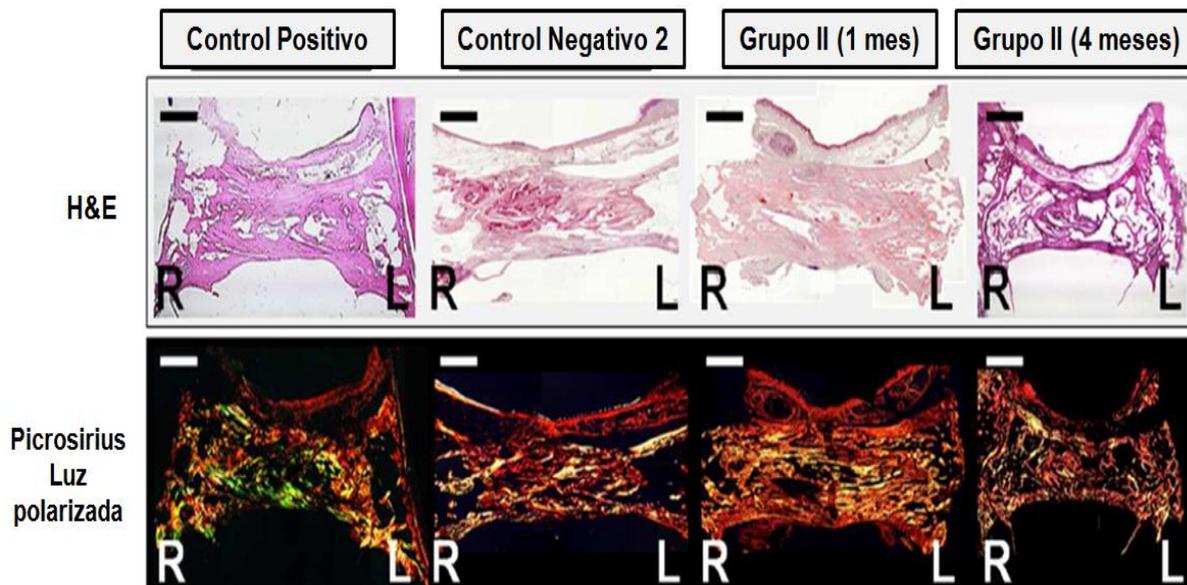


Figura 49. Estudio histológico de los distintos grupos mediante tinción con hemoxilina-eosina y picosirius con luz polarizada. Todas las imágenes corresponden a cortes coronales del hueso del paladar, incluyendo la parte derecha (R) operada y la parte izquierda (L) control. HB: animales del grupo de estudio II.

Por otro lado, el análisis de tejido óseo usando tinción de azul de toluidina confirmó una distribución más regular del tejido óseo, que muestra un patrón laminar con laminillas óseas bien organizadas que rodean las zonas vasculares en los CP y los animales del grupo II, tanto al mes del implante como a los 4 meses, con pocas áreas de tejido osteoide, especialmente después de 1 mes de la intervención quirúrgica. Por el contrario, los CN2 mostraron un patrón no laminar con varias áreas de tejido osteoide, similar al existente en muestras de hueso inmaduro.

Por último, el análisis de la expresión de la proteína MMP14 (Figura 50) mostró una expresión negativa en los CP, existiendo también negatividad de expresión de dicha proteína en el grupo II de animales, tanto después de un mes como tras 4 meses del implante quirúrgico. Sin embargo, los CN2 muestran algunas áreas de expresión de MMP14 en la matriz extracelular del tejido óseo regenerado.

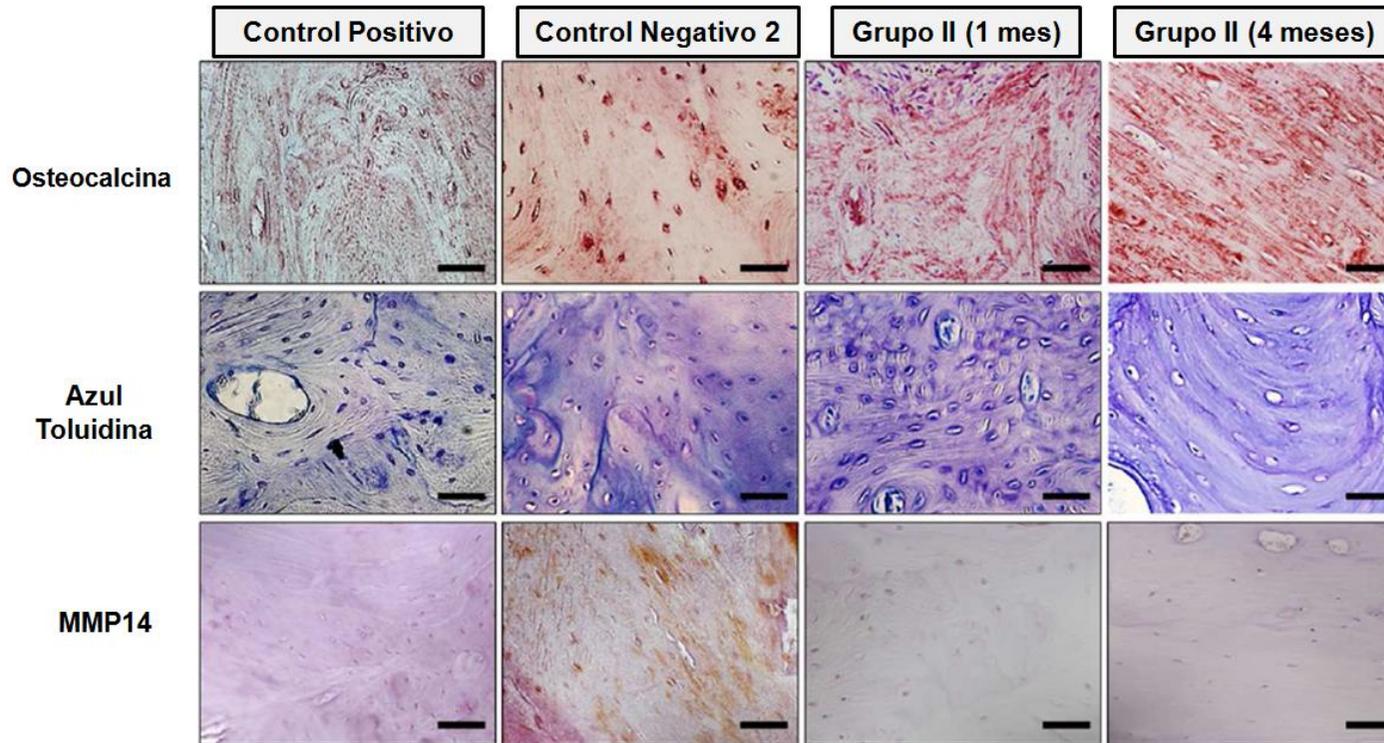


Figura 50. Análisis histológico e inmunohistoquímico de las muestras de los distintos grupos de estudio (CP, CN2 y animales del grupo II de 1 mes y 4 meses), para la presencia de osteocalcina, histoquímica con Azul de Toluidina y para la presencia de proteína MMP-14. Todas las imágenes corresponden al lado derecho del paladar, donde se realizó el procedimiento quirúrgico. Escala bar = 50 μ m.

DISCUSIÓN

La Ingeniería Tisular es una de las áreas de la biotecnología que más se ha desarrollado en los últimos años, debido a su capacidad potencial para la fabricación *in vitro* de tejidos y órganos para su implante en pacientes necesitados de los mismos. En el campo de la Medicina, nos encontramos, en ocasiones, con patologías que tienen difícil solución o resultados con complicaciones, y es en este campo en donde la Ingeniería Tisular nos ofrece alternativas, que según van demostrando los estudios publicados, reducen las complicaciones y mejoran los resultados.

La generación de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular depende, en la práctica, de dos factores fundamentales: la existencia de un sustrato tridimensional en el que las células puedan diferenciarse y proliferar adecuadamente, y la disponibilidad de una fuente de células madre con un potencial de viabilidad adecuado, ya que ésta viabilidad nos garantizará los resultados finales en su implante en seres vivos.

La reparación quirúrgica del defecto de la línea media en los pacientes con fisura palatina se basa en la restauración de la separación anatómica entre cavidad oral y nasal, para así conseguir recobrar las funciones tan importantes en la vida cotidiana como el habla, la masticación y la respiración, y preservar el potencial de crecimiento normal de la zona afectada a nivel palatino con buenos resultados estéticos. (Shi B 2015) Los inconvenientes y efectos secundarios de la estafilorrafia y la alveoloplastia actual hacen necesaria la búsqueda de herramientas terapéuticas alternativas para minimizar las complicaciones. En este contexto, el desarrollo reciente de la ingeniería tisular nos permite utilizar tejidos elaborados en laboratorio para la práctica clínica, sin necesidad de biopsias de tejidos autólogos para reconstrucción de defectos, como es el caso de las biopsias de cresta iliaca para la fisura alveolar, y evitando con

ello el dolor postoperatorio tan importante de estos pacientes. Hasta la fecha se han obtenido resultados prometedores con el uso clínico de varios tejidos elaborados mediante ingeniería tisular en niños, incluyendo piel (*Escamez, Garcia et al. 2010*), vejiga urinaria (*Atala 2008*) y mucosa oral (*Llames, Recuero et al. 2014*).

A lo largo de la presente Tesis se han estandarizado protocolos para la generación de sustitutos de mucosa y hueso palatino tanto *in vivo* como *in vitro* con el objetivo de valorar la utilidad clínica del uso de estos tejidos biológicos para la cirugía de la Fisura Palatina en un futuro, consiguiendo una separación entre cavidad oral y nasal más anatómica y un mejor crecimiento del hueso palatino, y minimizando las complicaciones.

En primer lugar, se cultivaron en el laboratorio los dos tipos celulares principales de la mucosa oral, los fibroblastos y los queratinocitos, así como las células madre mesenquimales de la grasa. Estos cultivos se obtuvieron a partir de pequeñas biopsias de mucosa palatina y tejido adiposo extraídas de animales de experimentación previamente anestesiados. Los cultivos de fibroblastos y de células madre de la grasa demostraron una elevada tasa de proliferación y un rápido crecimiento en medios de cultivo básicos, coincidiendo esto con otros estudios ya publicados (*Orwin and Hubel 2000; Teixeira, Nealey et al. 2004; Alaminos, Garzon et al. 2007; Sanchez-Quevedo, Alaminos et al. 2007*).

Uno de los primeros parámetros que analizamos fue la *viabilidad* de los diferentes pases de cultivos de las células madre mesenquimales del tejido adiposo para conocer que pases celulares eran los mejores para garantizar unos resultados finales más óptimos. En concreto, estos cultivos presentaban una supervivencia media superior al 82% mediante la técnica de azul tripán, siendo los pases P5 y P6 (93,83% y 92,18%, respectivamente) los que mayor supervivencia mostraban, con una diferencia estadísticamente significativa de P3 a P4 ($p < 0,0005$) y de P6 a P7 ($p < 0,0001$), y no existiendo diferencias significativas para el resto de los pases comparados. También se utilizaron ensayos mixtos de Live/Dead® para el estudio de la viabilidad, demostrando que los P7 y P8 (98,05% y 97,79%, respectivamente), seguidos de

P3 y P6 (97,29% y 97,23%, respectivamente), presentaban altos niveles de viabilidad. Estos resultados sugieren que éstos son los subcultivos que poseen mayor potencialidad para la fabricación de tejido óseo palatino mediante Ingeniería Tisular. Esto coincide con resultados previos de nuestro grupo de investigación en donde se demuestra que las células madre mesenquimales son altamente viables en el Pase 6 y por ello son las que deberían ser utilizadas para la terapia celular y las estrategias de Ingeniería Tisular (*Garzon, Perez-Kohler et al. 2012*), aunque no todas las células madre mesenquimales son iguales (*Martin-Piedra, Garzon et al. 2013*).

Algunos parámetros pueden influir en la viabilidad celular, como son: la edad de los animales y el método utilizado para la recogida de las células. Hay que señalar que las células utilizadas en la presente tesis doctoral se obtuvieron a partir de biopsias de tejido adiposo de conejos (de 3-4 semanas de vida). En este sentido, futuras investigaciones podrían estar encaminadas hacia la determinación de los patrones de viabilidad de las células mesenquimales obtenidas de pacientes de diferentes edades y con diferentes métodos de aislamiento celular, que podría afectar a la viabilidad celular (*Sieber and Van Beek 2013; Sieber, Suszynski et al. 2014*).

En segundo lugar, y una vez conseguida la proliferación y confluencia de los cultivos, se procedió a la fabricación de constructos artificiales de mucosa palatina y de hueso utilizando un soporte estromal compuesto por fibrina y agarosa al 0,1%, el cual nos permite construir sustitutos de mucosa y hueso con elevados índices de consistencia, lo cual favorece la manipulación para su posterior implante *in vivo*. Todo ello, basándonos en los resultados positivos obtenidos en estudios previos con andamios de fibrina-agarosa para la elaboración de tejidos artificiales (*Garzon, Serrato et al. 2009; Gonzalez-Andrades, Garzon et al. 2009; Carriel, Garzon et al. 2012; Carriel, Scionti et al. 2015*). La utilización de fibrina, al proceder de plasma sanguíneo, incorpora numerosas citoquinas y factores de crecimiento que generarán en su conjunto un microambiente adecuado para la proliferación celular. Además, también hemos utilizado las células madre mesenquimales en el seno de este biomaterial previamente diseñado para, mediante procesos de transdiferenciación (*Carriel, Garrido-Gomez et al. 2013; Garzon, Miyake et al. 2013*), obtener tejidos osteogénicos capaces de expresar genes osteoblásticos y desarrollar osteocitos, con adecuados niveles de calcificación demostrados *in*

vitro en algunos estudios (Nieto Aguilar R 2011), pero no evaluados *in vivo* hasta la presente Tesis.

Posteriormente, se procedió al implante de los distintos sustitutos obtenidos mediante ingeniería en los animales de experimentación, clasificando a los mismos en distintos grupos de estudio para su posterior comparación.

Los resultados del estudio *in vivo* confirmaron que la extirpación de la fibromucosa palatina junto con el periostio, con exposición ósea del paladar se asoció a un deterioro significativo de crecimiento y desarrollo del paladar, en comparación con los animales control positivo, en los que no se realizó ningún procedimiento. Aunque los resultados deben ser confirmados por estudios posteriores con un tamaño de muestra más grande, este modelo de defecto óseo del paladar puede reproducir la hipoplasia maxilar y del paladar óseo encontrado en los niños con paladar hendido y fisura alveolar (Panetta NJ 2008). Sin embargo, el uso de un **sustituto mucosa oral** completa mejoró significativamente el crecimiento y el desarrollo paladar, sin diferencias con los animales de control positivo. Esto sugiere que los sustitutos de mucosa oral obtenidos mediante ingeniería tisular fueron capaces de integrarse en el sitio del defecto y mejorar cicatrización palatina, la retracción y el crecimiento alterado, al funcionar como un reemplazo biológico eficiente de los tejidos blandos del paladar. Estos resultados sugieren que la utilización de un sustituto de mucosa oral completa es necesario para el crecimiento y desarrollo adecuados paladar.

Una vez que se analizaron las diferencias morfológicas entre los grupos de estudio, se evaluó la estructura de la mucosa palatina y el hueso para determinar si estos cambios morfológicos se asociaron a modificaciones histológicas.

Histológicamente, el hueso paladar consiste en una *matriz extracelular (MEC)* muy densa en la que varios tipos de células residen. La MEC es un complejo de macromoléculas autoensambladas predominantemente compuestas por colágenos, glicoproteínas,

proteoglicanos, fibras no colágenas y otros componentes (*Gentili and Cancedda 2009*), y todos estos componentes son importantes para la fisiología correcta del hueso, la diferenciación celular, nutrición celular, la difusión de oxígeno y otras funciones. (*Badyak 2007; Oliveira, Garzon et al. 2013*)

Uno de los principales componentes de la MEC ósea son fibras de *colágeno*, cuya presencia y la correcta orientación y organización son cruciales para un depósito, fijación y alineación adecuada de los cristales de hidroxapatita inorgánicos y para el anclaje de muchos de los otros constituyentes del hueso (*Camozzi, Vescini et al. 2010*). A su vez, las fibrillas de colágeno se asocian a moléculas decorina in vivo, que desempeñan un papel importante en la formación de dichas fibras de colágeno (*Reed and Iozzo 2002*). Tras este estudio, hemos encontrado en los CN1 existían alteraciones importantes de la cantidad y la compactación de las fibras de colágeno del hueso en el lado paladar intervenido, revelando que los cambios morfológicos que se encuentran en estos animales se asocian a las modificaciones histológicas de la MEC ósea, y ello, a su vez, dará lugar a una mucosa oral de peor calidad.

Al cubrir el defecto óseo con el sustituto autólogo de mucosa oral (grupo I) se produjo un efecto positivo sobre la cantidad y la compactación de las fibras de colágeno del hueso, que fueron similares en los animales del grupo de CP, y éste se acompañó por una mucosa oral bien estructurada e integrada en el sitio de acogida (zona del implante del injerto). Aunque se encontraron diferencias significativas para el colágeno, el análisis de *decorina* sugiere que este componente no varió del lado izquierdo al lado derecho en cualquiera de los grupos de estudio, por lo que esta proteína no parece verse afectada por el procedimiento de denudación hueso. Además, llegamos a la conclusión de que aunque la cantidad y la compactación de colágeno pueden ser diferentes entre los grupos de estudio, la estructura tridimensional y la maduración de las fibras de colágeno parecen ser similares en todos ellos.

Por otra parte, cabe destacar que la MEC ósea es rica en componentes orgánicos no colágenos tales como proteoglicanos y glicoproteínas. Los *proteoglicanos* están ampliamente distribuidos en la matriz ósea, donde están unidos a las superficies de fibrillas de colágeno y

actúan como reguladores importantes del crecimiento de fibrillas y la mineralización ósea (*de Souza Merli, de Medeiros et al. 2012; Eyre and Weis 2013*). Del mismo modo, las *glicoproteínas* asociadas a MEC ósea juegan un papel importante en el control del estado dinámico del metabolismo de la matriz y de las células, y se han detectado en las primeras etapas de la morfogénesis ósea (*de Souza Merli, de Medeiros et al. 2012*). Encontramos una mayor expresión de ambos componentes de la MEC en el lado derecho operado de animales correspondiente a CN1, lo que sugiere que el desarrollo óseo fue alterado de manera significativa después de que los tejidos blandos fueran retirados durante el crecimiento del paladar. De hecho, este hueso desarrollado rico en proteoglicanos y glicoproteínas, implica que este tejido se encuentra en un proceso de remodelación y regeneración. La correlación de estos resultados con los bajos contenidos de colágeno que se encuentra en el mismo hueso señala la posibilidad de que este hueso puede ser menos maduro que el hueso de control que se encuentra en el lado izquierdo no operado, ya que el contenido de matriz osteoide es generalmente pobre en fibras de colágeno y rica en proteoglicanos y glicoproteínas. En contraste, la aplicación de un sustituto de mucosa oral se asoció a un mejor desarrollo del tejido óseo con un contenido menor de proteoglicanos y glicoproteínas y una mayor cantidad de colágeno, no existiendo diferencias entre ambos lados del paladar. En conjunto, todos estos hallazgos demuestran que el uso de estos sustitutos artificiales elaborados mediante ingeniería sobre el hueso denudado fueron capaces de mejorar significativamente el desarrollo del hueso.

Por último, se analizó la expresión de dos componentes óseos que se sintetizan y expresan por los osteocitos: la osteocalcina y la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2). Ambas son esenciales para la unión del calcio y la mineralización ósea (*Camozzi, Vescini et al. 2010; Lo, Ulery et al. 2012*) y pueden desempeñar un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de los huesos. Los resultados encontrados revelan diferencias entre el lado derecho y el lado izquierdo para cualquiera de los grupos de animales. Esto sugiere que la fisiología normal de los osteoblastos se puede conservar en todos los grupos y que los cambios encontrados en el hueso paladar que queda expuesto al ambiente en los CN1 no afectó estas dos proteínas sintetizadas por los osteoblastos.

De acuerdo con nuestros resultados, la protección del hueso palatino por la mucosa oral es importante para el desarrollo del mismo, y la denudación de este hueso afecta al colágeno, los proteoglicanos y las glicoproteínas, pero no a la decorina, la osteocalcina o la BMP2. El uso de un sustituto de mucosa oral generado por bioingeniería que es capaz de integrarse en el tejido huésped, mejora del crecimiento y el desarrollo paladar mediante la prevención de las alteraciones encontradas en los casos con hueso denudado. Esta mejora se asocia a una mejor calidad a nivel histológico de la mucosa oral y de la MEC ósea, lo que sugiere que este hueso es más maduro y mejor diferenciado que el hueso denudado que se deja expuesto al medio ambiente oral. La razón por la cual el sustituto de mucosa oral es capaz de mejorar el desarrollo del hueso necesita el desarrollo de nuevos estudios. Una posibilidad es que el uso de un sustituto del tejido en el lado operado puede disminuir o prevenir la formación de cicatrices retráctiles. Otra posibilidad es que la mucosa oral artificial puede ser capaz de sintetizar y liberar importantes factores paracrinos inductivos que pueden ser necesarios para un adecuado crecimiento y desarrollo óseo del paladar. De hecho, los queratinocitos humanos son capaces de liberar y activar una serie de cascadas de señalización que se rigen por las interacciones de los queratinocitos de los receptores a través de circuitos autocrinos (*Suter, Schulze et al. 2009*) y paracrinos. Nuevos estudios serán necesarios para aclarar esta cuestión.

En conclusión, todos los resultados obtenidos en la presente Tesis apoyan la utilidad potencial de los sustitutos de mucosa oral generados mediante Ingeniería Tisular para el tratamiento de pacientes con fisura palatina y otros procedimientos quirúrgicos en los que sea necesaria la denudación del paladar, ya que son capaces de mejorar los resultados clínicos y evitar alteraciones en el crecimiento del paladar. Los ensayos clínicos futuros deberían encaminados a determinar si los resultados obtenidos en animales son reproducibles en los seres humanos.

Al realizar nuestro estudio sobre los **sustitutos de hueso** obtenidos mediante ingeniería tisular para reparar el defecto óseo, como ocurría en el caso de la utilización de sustitutos de mucosa palatina, también fueron capaces de mejorar el crecimiento y desarrollo del hueso palatino en los animales, y nuestros resultados sugieren que la tasa de crecimiento de ambos lados del paladar era equivalente y homogénea.

La extirpación de un cilindro óseo sin implante de ningún sustituto (CN2) origina una importante alteración del crecimiento en ese lado del paladar, diferencias que se acentúan con el crecimiento del animal, siendo mayores las diferencias, entre el lado no operado y el operado, cuando analizamos las medidas a los 4 meses tras la cirugía que al mes de la misma, se explica este hallazgo por dar más tiempo a que las alteraciones del crecimiento se manifiesten.

Durante los estudios morfométricos observamos que sólo los animales del grupo II que corresponden a 1 mes de evolución no difirieron de los controles positivos. Aunque estos animales deben compararse preferentemente en futuros trabajos con controles negativos correspondientes también al 1 mes de evolución, nuestro hallazgo puede explicarse por el hecho de que el crecimiento y desarrollo de los huesos del paladar es incompleto en los animales con 1 mes de seguimiento postoperatorio y por tanto, ambos lados de la boca son más similares. A los 4 meses, por otro lado, el crecimiento y el desarrollo de todo el hueso del paladar es completa y las diferencias son mayores, aunque significativamente mejores en comparación con los controles negativos (CN2).

Histológicamente, el hueso regenerado en el grupo sin implante de sustituto de hueso obtenido por ingeniería tisular, presenta una estructura de hueso desorganizado y con alta densidad ósea en la zona del procedimiento quirúrgico (estructura similar al cayo óseo tras fractura (*Devine, Mierisch et al. 2002*)), y un hueso bien estructurado en el lado no intervenido. Estos resultados están de acuerdo con nuestros hallazgos que muestran que este hueso alterado tenía baja expresión de osteocalcina, marcador histológico de diferenciación ósea, y alta expresión de MMP-14. La *MMP-14* es una metalopeptidasa de la matriz con un papel importante en el desarrollo y la remodelación del tejido de la MEC, y se ha asociado a la actividad de los osteoclastos y la reabsorción ósea durante la curación del hueso (*Wan, Kwan et al. 2008*). La alta expresión de este metalopeptidasa en este grupo de animales sugiere que este hueso no está completamente organizado y confirma la naturaleza inmadura de este hueso.

Sin embargo, nuestros resultados revelaron que la estructura histológica del hueso en animales del grupo II, en los que se implantó un sustituto óseo generada mediante ingeniería, era muy

similar a los controles positivos (CP). Después de 1 ó 4 meses de desarrollo, el hueso artificial injertado en el defecto paladar de los animales del grupo II fue capaz de inducir la formación de un tejido óseo bien estructurado cuya estructura se parecía al hueso normal encontrado en los CP. Estos resultados demuestran que el uso de un sustituto óseo generado mediante ingeniería es capaz de inducir eficazmente la regeneración de un tejido óseo maduro y correctamente estructurado, y estos hallazgos fueron confirmados por la expresión del marcador óseo osteocalcina, y la baja cantidad de tejido osteoide encontrado junto con la falta de señal de la MMP-14. Todos estos hallazgos encontrados sugieren que los sustitutos óseos generados por Ingeniería Tisular pueden ser usados para inducir la formación de un hueso y esto abre una puerta a una futura aplicación clínica de estos sustitutos óseos.

Sin embargo, algunos estudios deben de realizarse con el uso de tejidos generados mediante bioingeniería combinados con proteínas morfogenéticas óseas tales como rBMP-2, que previamente demostró su capacidad para mejorar la regeneración ósea mediada por ADSCs.

(Levi, James et al. 2011)

A pesar de los prometedores resultados obtenidos, la presente Tesis tiene varias limitaciones. En primer lugar, nuestro modelo animal no era un modelo de fisura palatina real, sino un modelo en el que parte del hueso del paladar se había extirpado quirúrgicamente. Aunque la mayoría de los estudios utilizan un modo de paladar pseudo-hendido, los estudios futuros deben evaluar el efecto de sustitutos óseos bioingeniería en animales con paladar hendido y determinar si los resultados son extrapolables a esta situación clínica. En segundo lugar, la eficacia clínica de los sustitutos óseos generados por ingeniería debe ser comparada con otros tipos de injertos de hueso y con controles evaluados en 1 mes, y nuevos estudios debería utilizar injertos óseos disponibles comercialmente. Finalmente, el pequeño grupo de animales incluidos en cada grupo de este estudio preliminar justifica la necesidad de realizar estudios futuros con mayor tamaño de muestra.

En resumen, todos estos resultados sugieren que el uso de un sustituto óseo generado mediante ingeniería con un andamio de fibrina-agarosa, podría inducir la generación de un tejido óseo bien estructurado similar al hueso nativo, mejorando los resultados clínicos y evitando alteraciones en el crecimiento de hueso. Y todo ello da evidencia sobre la posibilidad de utilizar los tejidos elaborados mediante ingeniería tisular para la reparación quirúrgica de los defectos de paladar hendido en los pacientes.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis podemos establecer las siguientes

Conclusiones:

1. Los métodos y las técnicas desarrolladas en esta Tesis Doctoral permitieron el aislamiento y la expansión eficiente de células epiteliales de estirpe queratinocítica y estromales de estirpe fibroblástica a partir de pequeñas biopsias de mucosa palatina de animales de experimentación, así como de células madre mesenquimales obtenidas de biopsias de tejido adiposo de los mismos animales. El análisis de viabilidad celular mediante métodos de exclusión de azul tripán permitió determinar que los pases celulares más viables eran P5 y P6, mientras que los pases más viables de acuerdo al método mixto eran P7, P8, P3 y P6. Estos datos confirman la diferente sensibilidad de cada técnica y sugieren que las células madre mesenquimales del tejido adiposo del conejo de laboratorio podrían utilizarse en protocolos de ingeniería tisular hasta el pase P8.
2. La combinación de biomateriales nanoestructurados de fibrina-agarosa y células fibroblásticas y queratinocíticas en cultivo permitió elaborar sustitutos eficientes de la mucosa palatina mediante Ingeniería Tisular compuestos por un estroma rico en células, matriz extracelular y un epitelio estratificado. El implante de estos sustitutos a nivel del paladar duro en un modelo *in vivo* de denudación del hueso palatino de animales de laboratorio permitió prevenir significativamente las alteraciones del crecimiento y el desarrollo palatino encontradas en los animales control, obteniéndose parámetros morfométricos compatibles con la normalidad. El análisis histológico del tejido mucoso palatino de estos animales reveló adecuados niveles de biointegración del sustituto de mucosa palatina en el animal receptor, mientras que el tejido óseo palatino subyacente mostró adecuada estructura, orientación y compactación de las fibras de colágeno y del contenido de decorina, proteoglicanos, glicoproteínas, osteocalcina y BMP2. Todo esto sugiere que el injerto de tejido mucoso palatino es capaz de prevenir las alteraciones morfoestructurales existentes en el grupo control y

demuestra la utilidad de los sustitutos de mucosa palatina para el tratamiento de lesiones de la mucosa del paladar en un modelo de denudación palatina.

3. La combinación de biomateriales nanoestructurados de fibrina-agarosa con células madre mesenquimales del tejido adiposo y métodos de diferenciación osteogénica permitió elaborar sustitutos eficientes del hueso palatino mediante ingeniería tisular. El implante de estos sustitutos de hueso a nivel del paladar duro en un modelo *in vivo* de fisura palatina en animales de laboratorio permitió prevenir significativamente las alteraciones del crecimiento y el desarrollo palatino encontradas en los animales control, obteniéndose parámetros morfométricos compatibles con la normalidad. El análisis histológico del hueso palatino de estos animales reveló adecuados niveles de biointegración del sustituto de hueso palatino en el animal receptor, cuyas fibras de colágeno presentaron un patrón regular de alineación comparable con la zona control. Asimismo, el análisis de osteocalcina, MMP14 y azul de toluidina permitió concluir que el hueso formado a nivel del injerto óseo palatino era estructuralmente análogo al hueso control. Todo esto sugiere que el injerto de tejido óseo palatino es capaz de prevenir las alteraciones morfoestructurales existentes en el grupo control y demuestra la utilidad de los sustitutos de hueso palatino para el tratamiento de lesiones de la mucosa del paladar en un modelo de fisura palatina.

BIBLIOGRAFÍA

- Alaminos, M., I. Garzon, et al. (2007). "Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa." J Tissue Eng Regen Med **1**(5): 350-359.
- Alaminos M, S.-Q. M., Munoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. (2006). "Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(8): 3311-3317.
- Atala, A. (2008). "Bioengineered tissues for urogenital repair in children." Pediatr Res **63**(5): 569-575.
- Awad, H. A., M. Q. Wickham, et al. (2004). "Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds." Biomaterials **25**(16): 3211-3222.
- B Malafaya PP, A. J. Pedro, et al. (2005). "Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells." J Mater Sci Mater Med **16**(12): 1077-1085.
- Badylak, S. (2007). "The extracellular matrix as a biologic scaffold material." Biomaterials. **Sep;28(25)**: 3587-3593.
- Bardach, J., H. L. Morris, et al. (1984). "Late results of primary veloplasty: the Marburg Project." Plast Reconstr Surg **73**(2): 207-218.
- Behnia H, K. A., Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A. (2012). "Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report." J Craniomaxillofac Surg. **Jan;40(1)**: 2-7.
- Behnia H, K. A., Soleimani M, Tehranchi A, Khoshzaban A, Keshel SH, Atashi R (2009). "Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **108**(2): e1-6.
- Behnia H, K. A., Soleimani M, Tehranchi A, Khoshzaban A, Keshel SH, Atashi R. (2009). "Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. **Aug;108(2)**: e1-6.
- Butler CE (2001). "Skin grafts used in combination with free flaps for intraoral oncological reconstruction." Ann Plast Surg **Sep;47(3)**: 293-298.
- Camozzi, V., F. Vescini, et al. (2010). "Bone organic matrix components: their roles in skeletal physiology." J Endocrinol Invest **33**(7 Suppl): 13-15.
- Carriel, V., J. Garrido-Gomez, et al. (2013). "Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration." J Neural Eng **10**(2): 026022.
- Carriel, V., I. Garzon, et al. (2012). "Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials." Cells Tissues Organs **196**(1): 1-12.
- Carriel, V., G. Scionti, et al. (2015). "In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute." J Tissue Eng Regen Med.
- Clark R, S. A. (2000). "Wound repair: basic biology to tisular engineering." En: Lanza RP, Langer, Vacanti J. Principles of tisular engineering 2nd edition Ed. US. Elsevier.: 857-878.
- Costea, D. E., L. L. Loro, et al. (2003). "Crucial effects of fibroblasts and keratinocyte growth factor on morphogenesis of reconstituted human oral epithelium." J Invest Dermatol **121**(6): 1479-1486.
- Chapman, K. L. (2004). "Is presurgery and early postsurgery performance related to speech and language outcomes at 3 years of age for children with cleft palate?" Clin Linguist Phon **18**(4-5): 235-257.
- Cho-Lee, G. Y., E. M. Garcia-Diez, et al. (2013). "Review of secondary alveolar cleft repair." Ann Maxillofac Surg **3**(1): 46-50.

- Cho HH, P. H., Kim YJ, Bae ChJ, Shu KT, Jung JS. (2005). "Induction of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell by histone deacetylase inhibitors." J. of Cell. Biochem. **96**: 533-542.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2001). "Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age." Arthritis Rheum **44**(1): 85-95.
- De Scott TG, B. G., Ashley M, et al. (2013). "Avances en bionanomateriales para la ingeniería de tejido óseo." J NanoSci Nanotechnol. **13**: 1-22.
- de Souza Merli, L. A., V. P. de Medeiros, et al. (2012). "The low level laser therapy effect on the remodeling of bone extracellular matrix." Photochem Photobiol **88**(5): 1293-1301.
- De Ugarte DA, A. Z., Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK (2003). "Differential expression of stem cell mobilization associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow." Immunol. Lett. **89**: 267-270.
- Devine, M. J., C. M. Mierisch, et al. (2002). "Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model." J Orthop Res **20**(6): 1232-1239.
- Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Eichner R, B. P., Sun TT. (1984). "Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression." J Cell Biol **98**: 1388-1396.
- Escamez, M. J., M. Garcia, et al. (2010). "The first COL7A1 mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation." Br J Dermatol **163**(1): 155-161.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-156.
- Eyre, D. R. and M. A. Weis (2013). "Bone collagen: new clues to its mineralization mechanism from recessive osteogenesis imperfecta." Calcif Tissue Int **93**(4): 338-347.
- Ferraris ME, C. A. (2002). "Histología y Embriología Bucodental." Ed. Panamericana. Madrid.
- Franke WW, S. D., Moll R, Winter S, Schmid E, Engelbrecht I, Denk H, Krepler R, Platzer B. (1981). "Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues." J Mol Biol. **Dec 25;153**(4): 933-959.
- Friede, H. and H. Enemark (2001). "Long-term evidence for favorable midfacial growth after delayed hard palate repair in UCLP patients." Cleft Palate Craniofac J **38**(4): 323-329.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, et al. (1974). "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo." Transplantation **17**(4): 331-340.
- Fujioka, M. and T. Fujii (1997). "Maxillary growth following atelocollagen implantation on mucoperiosteal denudation of the palatal process in young rabbits: implications for clinical cleft palate repair." Cleft Palate Craniofac J **34**(4): 297-308.
- Fujioka, M. a. T. F. (1997). "Maxillary growth following atelocollagen implantation on mucoperiosteal denudation of the palatal process in young rabbits: implications for clinical cleft palate repair. ." Cleft Palate Craniofac J. **34**(4): 297-308.
- Garzon, I., J. Miyake, et al. (2013). "Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration." Stem Cells Transl Med **2**(8): 625-632.

- Garzon, I., B. Perez-Kohler, et al. (2012). "Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy." Tissue Eng Part C Methods **18**(6): 408-419.
- Garzon, I., M. C. Sanchez-Quevedo, et al. (2009). "In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa." J Periodontol Res **44**(5): 588-597.
- Garzon, I., D. Serrato, et al. (2009). "In vitro cytokeratin expression profiling of human oral mucosa substitutes developed by tissue engineering." Int J Artif Organs **32**(10): 711-719.
- Geijsen, N., M. Horoschak, et al. (2004). "Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells." Nature **427**(6970): 148-154.
- Gentili, C. and R. Cancedda (2009). "Cartilage and bone extracellular matrix." Curr Pharm Des **15**(12): 1334-1348.
- Gonzalez-Andrades, M., I. Garzon, et al. (2009). "Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas." J Tissue Eng Regen Med **3**(6): 442-449.
- Gupta, D. M., N. J. Panetta, et al. (2009). "The use of polymer scaffolds in skeletal tissue engineering applications." J Craniofac Surg **20**(3): 860-861.
- Hara, S., M. Mitsugi, et al. (2013). "Bone transport and bone graft using auto-tooth bone for alveolar cleft repair." J Craniofac Surg **24**(1): e65-68.
- Hattori H, M. K., Sato M, Ishihara M, Asazuma T, Takase B, Kikuchi M, Nemoto K, Ishihara M. (2006). "Bone formation using human adipose tissue derived stromal cells and a biodegradable scaffold." J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater. **76**(B): 230-239.
- Hoskins, J. M., G. G. Meynell, et al. (1956). "A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumour cells." Exp Cell Res **11**(2): 297-305.
- Hotz, M. M. and W. M. Gnoinski (1979). "Effects of early maxillary orthopaedics in coordination with delayed surgery for cleft lip and palate." J Maxillofac Surg **7**(3): 201-210.
- Hu, Y., L. Liao, et al. (2003). "Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas." J Lab Clin Med **141**(5): 342-349.
- Im GI, S. Y., Lee KB. (2005). "do adipose tissue derived mnesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow derived cells." Osteoarthritis Cartilage **13**: 845-853.
- in 't Anker, P. S., W. A. Noort, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential." Haematologica **88**(8): 845-852.
- Inatomi, T., T. Nakamura, et al. (2006). "Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation." Am J Ophthalmol **141**(2): 267-275.
- Ionescu, A. M., M. Alaminos, et al. (2011). "Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: rheological properties." J Mech Behav Biomed Mater **4**(8): 1963-1973.
- Ito, S., M. Noguchi, et al. (2006). "Speech evaluation and dental arch shape following pushback palatoplasty in cleft palate patients: Supraperiosteal flap technique versus mucoperiosteal flap technique." J Craniomaxillofac Surg **34**(3): 135-143.
- Jankowski, R. J., B. M. Deasy, et al. (2002). "Muscle-derived stem cells." Gene Ther **9**(10): 642-647.
- Jansen, R. G., A. M. Kuijpers-Jagtman, et al. (2008). "Collagen scaffolds implanted in the palatal mucosa." J Craniofac Surg **19**(3): 599-608.
- Knight MA, E. G. (2004). "Tissue engineering: progress and challenges." Plast Reconstr Surg. **Aug;114**(2): 26E-37E.
- Kriens, O. B. (1969). "An anatomical approach to veloplasty." Plast Reconstr Surg **43**(1): 29-41.

- LaRossa, D. (2000). "Unilateral cleft lip repair. In: Plastic surgery: indications, operations, and outcomes." Ed. Mosby, St. Louis.
- LaRossa, D., O. H. Jackson, et al. (2004). "The Children's Hospital of Philadelphia modification of the Furlow double-opposing z-palatoplasty: long-term speech and growth results." Clin Plast Surg **31**(2): 243-249.
- Lauer, G., R. Schimming, et al. (2001). "Intraoral wound closure with tissue-engineered mucosa: new perspectives for urethra reconstruction with buccal mucosa grafts." Plast Reconstr Surg **107**(1): 25-33.
- Lavik E, L. R. (2004). "Tissue engineering: current state and perspectives." Appl Microbiol Biotechnol **Jul;65**(1): 1-8.
- Leon Pérez J.A., S. B. A. L., Fernández Sobrino G. (2009). "Palatoplastia con incisiones mínimas: Proposición de una técnica y revisión de la literatura." Cir. plást. iberolatinoam. **35**(1): 19-26.
- Levi, B., A. W. James, et al. (2011). "Human adipose-derived stromal cells stimulate autogenous skeletal repair via paracrine Hedgehog signaling with calvarial osteoblasts." Stem Cells Dev **20**(2): 243-257.
- Lin, C. S., Z. C. Xin, et al. (2008). "Recent advances in andrology-related stem cell research." Asian J Androl **10**(2): 171-175.
- Lin, Y., E. Luo, et al. (2005). "Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo." J Cell Mol Med **9**(4): 929-939.
- Lo, K. W., B. D. Ulery, et al. (2012). "Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair." Adv Drug Deliv Rev **64**(12): 1277-1291.
- Lubker, J. F. (1975). "Normal velopharyngeal function in speech." Clin Plast Surg **2**(2): 249-259.
- Llames, S., I. Recuero, et al. (2014). "Tissue-engineered oral mucosa for mucosal reconstruction in a pediatric patient with hemifacial microsomia and ankyloglossia." Cleft Palate Craniofac J **51**(2): 246-251.
- Llames, S. G., M. Del Rio, et al. (2004). "Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin." Transplantation **77**(3): 350-355.
- Martin-Piedra, M. A., I. Garzon, et al. (2013). "Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering." Cytotherapy **15**(4): 507-518.
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7634-7638.
- Mathes (2006). "Plastic Surgery. Pediatric PLastic Surgery." Saunders Elsevier. **vol4.**
- Matsui, Y., D. Toksoz, et al. (1991). "Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture." Nature **353**(6346): 750-752.
- McCarthy, J. (1990). "Plastic Surgery. Cleft Lip and craniofacial anomalies. ." W.B. Saunders Company. **vol4.**
- Meana A, I. J., Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martin C, San Roman F, Tevar F. (1998). "Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels." Burns **Nov;24**(7): 621-630.
- Meara, D. J., N. R. Livingston, et al. (2011). "Continuous infusion of bupivacaine for pain control after anterior iliac crest bone grafting for alveolar cleft repair in children." Cleft Palate Craniofac J **48**(6): 690-694.

- Mehlhorn, A. T., P. Niemeyer, et al. (2006). "Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue." Tissue Eng **12**(10): 2853-2862.
- Meruane M, S. C., Rojas M (2012). "Desarrollo de Cara y Cuello en Vertebrados." Int. J. Morphol. **30**(4): 1373-1388.
- Mitchell JB, M. K., Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. (2003). "Immunophenotype of human adipose-derived cells: Temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers." Stem Cells. **24**: 376-385.
- Miura, M., S. Gronthos, et al. (2003). "SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5807-5812.
- Moharamzadeh K, C. H., Murdoch C, et al. (2012). "Tissue-engineered oral mucosa." J Dent Res. **Jul;91**(7): 645-650.
- Mohr LR, T. A. (1980). "The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. ." J Reprod Fertil **58**(1): 189-196.
- Molist P, P. M., Megías M. (2014). "Atlas en histología vegetal y animal. ." Depto. de biología funcional y ciencias de la salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.
- Moll, R., W. W. Franke, et al. (1982). "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." Cell **31**(1): 11-24.
- Montalvo, A. (2008). "Evaluación genética y microanalítica de las células madre de la gelatina de wharton para su utilización en Ingeniería Tisular (Tesis Doctoral)." Universidad de Granada.
- Montalvo Arenas, C. (2010). "Biología celular e histología médica. Tejido Adiposo." Departamento de Cirugía Celular y Tisular. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Moreau, J. L., J. F. Caccamese, et al. (2007). "Tissue engineering solutions for cleft palates." J Oral Maxillofac Surg **65**(12): 2503-2511.
- Nieto Aguilar, R. (2010). "Ingeniería de tejidos oro-faciales elaborados por transdiferenciación de células troncales mesenquimales humanas." Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Nieto Aguilar R, S. D., Garzón I, et al. (2011). "Pluripotential Differentiation Capability of Human Adipose-derived Stem Cells in a Novel Fibrin-agarose Scaffold." J Biomater Appl. **25**: 743-768.
- Noth, U., A. M. Osyczka, et al. (2002). "Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells." J Orthop Res **20**(5): 1060-1069.
- O'Driscoll, S. W. (1999). "Articular cartilage regeneration using periosteum." Clin. Orthop. Relat. Res **Oct;(367 Suppl)**: S186-203.
- Oldham, K. T., Colombani, Paul M, Foglia, Robert P, Skinner, Michael A. (2005). "Principles and Practice of Pediatric Surgery, 4th Edition." Ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Oliveira, A. C., I. Garzon, et al. (2013). "Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering." PLoS One **8**(6): e66538.
- Ophof, R., J. C. Maltha, et al. (2004). "Histologic evaluation of skin-derived and collagen-based substrates implanted in palatal wounds." Wound Repair Regen **12**(5): 528-538.
- Ophof R, M. J., Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. (2008). "Implantation of tissue-engineered mucosal substitutes in the dog palate." Eur J Orthod **30**(1): 1-9.
- Orwin, E. J. and A. Hubel (2000). "In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix." Tissue Eng **6**(4): 307-319.
- Owens K W, Y. R. A. (2001). "Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study." Implant Dentistry. **10**: 49-58.

- Panetta NJ, G. D., Slater BJ, et al. (2008). "Tissue engineering in cleft palate and other congenital malformations." Pediatr Res. **May;63(5)**: 545-551.
- Paolantonio, M., M. Dolci, et al. (2002). "Subpedicle acellular dermal matrix graft and autogenous connective tissue graft in the treatment of gingival recessions: a comparative 1-year clinical study." J Periodontol **73(11)**: 1299-1307.
- Papadopoulos, N. D., GV. Spanakos, G. Gritzapis, AD. Baxevanis, CN. Papamichail, M. (1994). "An improved fluorescence assay for the determination of lymphocytemediated cytotoxicity using flow cytometry." J Immunol Methods **177(1-2)**: 101-111.
- Patterson, M. K., Jr. (1979). "Measurement of growth and viability of cells in culture." Methods Enzymol **58**: 141-152.
- Petruzzelli GJ, J. J., Myers EN, Kline JM. (1992). "Histomorphometric analysis of intraoral split-thickness skin grafts." Head Neck. **Mar-Apr;14(2)**: 119-124.
- Pigott, R. W., E. H. Albery, et al. (2002). "A comparison of three methods of repairing the hard palate." Cleft Palate Craniofac J **39(4)**: 383-391.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284(5411)**: 143-147.
- Pourebrahim N, H. B., Shahnasari S, et al. (2013). "A comparison of tissue-engineered bone from adipose-derived stem cell with autogenous bone repair in maxillary alveolar cleft model in dogs." Int J Oral Maxillofac Surg. **May;42(5)**: 562-568.
- Pradel W, L. G. (2012). "Tissue-engineered bone grafts for osteoplasty in patients with cleft alveolus." Ann Anat. **Nov;194(6)**: 545-548.
- Qin Y, Z. C., Wang N, Yang H, Gao WQ. (2015). "Conversion of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells to Neural Stem Cell-Like Cells by a Single Transcription Factor, Sox2." Cell Reprogram. **Jun;17(3)**: 221-226.
- Quinlan, R. A., D. L. Schiller, et al. (1985). "Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments." Ann N Y Acad Sci **455**: 282-306.
- Raff, M. (2003). "Adult stem cell plasticity: fact or artifact?" Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 1-22.
- Raul, U., S. Sawant, et al. (2004). "Implications of cytokeratin 8/18 filament formation in stratified epithelial cells: induction of transformed phenotype." Int J Cancer **111(5)**: 662-668.
- Reed, C. C. and R. V. Iozzo (2002). "The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis." Glycoconj J **19(4-5)**: 249-255.
- Reichl S, M.-G. C. (2003). "The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride." Int J Pharm **Jan 2;250(1)**: 191-201.
- Resnick, J. L., L. S. Bixler, et al. (1992). "Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture." Nature **359(6395)**: 550-551.
- Rohrich, R. J., A. R. Rowsell, et al. (1996). "Timing of hard palatal closure: a critical long-term analysis." Plast Reconstr Surg **98(2)**: 236-246.
- Romagnoli, C., R. Zonefrati, et al. (2015). "In Vitro Behavior of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells on Poly(epsilon-caprolactone) Film for Bone Tissue Engineering Applications." Biomed Res Int **2015**: 323571.
- Rosenthal, E., W. Carroll, et al. (2004). "Simplifying head and neck microvascular reconstruction." Head Neck **26(11)**: 930-936.
- Rotman B, P. B. (1966). "Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. ." Proc Natl Acad Sci U S A **55(1)**: 134-141.
- Sadove, M. (2004). "Cleft palate repair: art and issues." Clin Plast Surg **31**: 231-232.

- Sanchez-Quevedo, M. C., M. Alaminos, et al. (2007). "Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering." Histol Histopathol **22**(6): 631-640.
- Scionti, G. (2014). "Evaluación de las propiedades biomecánicas de tejidos artificiales elaborados con biopolímeros para su utilización en ingeniería tisular." Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Scionti, G., M. Moral, et al. (2014). "Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model." J Biomed Mater Res A **102**(8): 2573-2582.
- Schaffler A, B. C. (2007). "Concise review: Adipose tissue derived stromal cells basic and clinical applications for novel cell-based therapies " Stem Cells **25**: 818-827.
- Shafiee, A., M. Kabiri, et al. (2015). "Evaluation and comparison of the in vitro characteristics and chondrogenic capacity of four adult stem/progenitor cells for cartilage cell-based repair." J Biomed Mater Res A.
- Shah JP, P. S. (2004). "Cirugía Reconstructora." Shah JP, Patel SG, eds. Cirugía y Oncología de Cabeza y Cuello 3a edición. Madrid: Elsevier España.: 589-631.
- Shamblott, M. J., J. Axelman, et al. (1998). "Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13726-13731.
- Shi B, L. J. (2015). "The impact of cleft lip and palate repair on maxillofacial growth." Int J Oral Sci. Mar **23;7(1)**: 14-17.
- Sieber, D. A., T. M. Suszynski, et al. (2014). "Critical need for accurate and quantitative viability assays to optimize fat grafting protocols." Aesthet Surg J **34**(3): 475-476.
- Sieber, D. A. and A. L. Van Beek (2013). "Are We Killing Our Fat Cells before Grafting Them?" Plast Reconstr Surg Glob Open **1**(9): e79.
- Simmons PJ, T. S. B. (1991). "Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1." Blood **78**: 55-62.
- Slack, J. (2002). "Essential developmental biology. 2ª ed. ." Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Smith, A. (2006). "A glossary for stem-cell biology." Nature **441**: 1060.
- Sommerlad, B. C. (2003). "A technique for cleft palate repair." Plast Reconstr Surg **112**(6): 1542-1548.
- Sorolla, J. P. (2010). "Anomalías Craneofaciales." Red. Med. Clin. Condes **21 (1)**: 5-15.
- Suter, M. M., K. Schulze, et al. (2009). "The keratinocyte in epidermal renewal and defence." Vet Dermatol **20**(5-6): 515-532.
- Teixeira, A. I., P. F. Nealey, et al. (2004). "Responses of human keratocytes to micro- and nanostructured substrates." J Biomed Mater Res A **71**(3): 369-376.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-1147.
- Thowfeequ, S., E. J. Myatt, et al. (2007). "Transdifferentiation in developmental biology, disease, and in therapy." Dev Dyn **236**(12): 3208-3217.
- Torikai, K., T. Hirakawa, et al. (2009). "Primary alveolar bone grafting and gingivoperiosteoplasty or gingivomucoperiosteal flap at the time of 1-stage repair of unilateral cleft lip and palate." J Craniofac Surg **20 Suppl 2**: 1729-1732.
- Troyer, D. L. and M. L. Weiss (2008). "Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population." Stem Cells **26**(3): 591-599.
- Tsai R.Y., K. R., McKay R.D. (2002). "Plasticity, niches, and the use of stem cells. ." Dev. Cell. **2**(6): 707-712.
- Urken ML (1995). "Free Flaps. Radial Forearm. ." Urken M, Cheney M, Sullivan MJ, Biller H, eds. Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. New York: 261-290.

- van der Velden, L. A., J. J. Manni, et al. (1999). "Expression of intermediate filament proteins in benign lesions of the oral mucosa." Eur Arch Otorhinolaryngol **256**(10): 514-519.
- van Hout WM, M. v. d. M. A., Breugem CC, Koole R, Van Cann EM. (2011). "Reconstruction of the alveolar cleft: can growth factor-aided tissue engineering replace autologous bone grafting? A literature review and systematic review of results obtained with bone morphogenetic protein-2." Clin Oral Investig. **Jun;15(3)**: 297-303.
- Walgenbach, K. J., M. Voigt, et al. (2001). "Tissue engineering in plastic reconstructive surgery." Anat Rec **263**(4): 372-378.
- Wan, D. C., M. D. Kwan, et al. (2008). "Global age-dependent differences in gene expression in response to calvarial injury." J Craniofac Surg **19**(5): 1292-1301.
- Wei, Y., X. Sun, et al. (2007). "Adipose-derived stem cells and chondrogenesis." Cytotherapy **9**(8): 712-716.
- Weinzierl, K., A. Hemprich, et al. (2006). "Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells." J Craniomaxillofac Surg **34**(8): 466-471.
- Witzel, M. A., K. E. Salyer, et al. (1984). "Delayed hard palate closure: the philosophy revisited." Cleft Palate J **21**(4): 263-269.
- Xu Y, M. P., Wagner DR, Longaker MT. (2005). "Adipose-derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal generation." Curr. Opin. Mol. Ther. **7**: 300-305.
- Yang S., L. K., Du Z., Chua C. (2001). "The design of scaffolds for use in tissue engineering: Part I. Traditional factors." Tissue Eng. **7**(6): 679-689.
- Yoo G, L. J. (2009). "Tissue engineering of injectable soft tissue filler: using adipose stem cells and micronized acellular dermal matrix." J. Korean Med. Sci. **24**: 104-109.
- Yoshimura K, S. K., Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Hiroi T, Harii K. (2008). "Cell assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose derived stem cell." Dermatol. Surg. **34**(9): 1178-1185.
- Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, et al. (2000). "Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals." Arthritis Res **2**(6): 477-488.