



Universidad de Granada
Facultad de Medicina

ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN
MORFOESTRUCTURAL DE UN
SUSTITUTO COMPLETO DEL PALADAR
DURO GENERADO MEDIANTE
INGENIERÍA TISULAR

TESIS DOCTORAL

Ricardo Fernández-Valadés Gámez

2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ricardo Fernández-Valadés Gámez
ISBN: 978-84-1306-098-9
URI: <http://hdl.handle.net/10481/54778>

**ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN
MORFOESTRUCTURAL DE UN SUSTITUTO
COMPLETO DEL PALADAR DURO GENERADO
MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR**

Memoria que presenta el licenciado en Medicina
Ricardo Fernández-Valadés Gámez
para aspirar al título de Doctor

Fdo. Ricardo Fernández-Valadés Gámez

VºBº Director de Tesis
Fdo. Dr. D. Ricardo Fernández Valadés
Doctor en Medicina y Cirugía
Hospital Universitario
Virgen de las Nieves de Granada

VºBº Director de Tesis
Fdo. Dr. D. Miguel Alaminos Mingorance
Doctor en Medicina y Cirugía
Doctor en Ciencias Biológicas
Universidad de Granada

Departamento de Histología
Universidad de Granada

2018

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada y financiada por el proyecto de investigación titulado GENERACIÓN DE UN CONSTRUCTO COMPLETO DE PALADAR PARA USO CLINICO (FIS PI14/2110) del Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad.

Los resultados han sido parcialmente publicados en el siguiente artículo científico:

Martín-Piedra MA, Alaminos M, Fernández-Valadés-Gámez R, España-López A, Licerias-Licerias E, Sánchez-Montesinos I, Martínez-Plaza A, Sánchez-Quevedo MC, Fernández-Valadés R, Garzón I. Development of a multilayered palate substitute in rabbits: a histochemical ex vivo and in vivo analysis. Histochem Cell Biol. 2017 Mar;147(3):377-388. doi: 10.1007/s00418-016-1489-5. Epub 2016 Sep 6. PMID: 27600719

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer en primer lugar a mis padres y mi familia por todo el apoyo, no sólo durante la elaboración de esta Tesis Doctoral, sino también durante los años de la carrera y la residencia.

Merecen especial atención mis directores, el Dr. Miguel Alaminos Mingorance, que posee unas ganas inagotables de trabajar, enseñar y de investigar en este campo tan interesante y con tanto desarrollo como es la Ingeniería Tisular. Esta tesis no podría haber sido posible sin la ayuda de mi otro director, el Dr. Ricardo Fernández Valadés, al que ya he mencionado en el párrafo anterior.

Le agradezco también a todo el grupo del Departamento de Histología por su ayuda inestimable en el desarrollo de los cultivos; y a todo el personal del animalario de la Unidad Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y el Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, especialmente a Amalia y Concha, que han colaborado con el cuidado de los animales.

No puedo olvidarme de mis compañeros del hospital, en especial de mis compañeros de residencia, por las veces que han tenido que cubrirme y el apoyo que me han dado durante estos años.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	4
INTRODUCCIÓN	8
CARACTERÍSTICAS DEL PALADAR HUMANO	8
I. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PALADAR HUMANO	8
II. ANATOMÍA DEL PALADAR HUMANO	11
III. HISTOLOGÍA DEL PALADAR	13
PATOLOGÍA DEL PALADAR HUMANO	20
I. PATOLOGÍA CONGÉNITA. FISURA LABIOPALATINA	21
II. PATOLOGÍA ADQUIRIDA	27
LA INGENIERÍA TISULAR	28
I. CÉLULAS	29
II. BIOMATERIALES	30
III. FACTORES DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN	31
IV. INGENIERÍA TISULAR EN TRATAMIENTO DE FISURADOS LABIOPALATINOS	32
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	37
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	37

GENERACIÓN DE CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS	38
GENERACIÓN DE UN SUSTITUTO COMPLETO DEL PALADAR DURO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR	40
I. GENERACIÓN DE SUSTITUTO ÓSEO PALATINO POR INGENIERÍA TISULAR	40
II. GENERACIÓN DE SUSTITUTO DE MUCOSA ORAL PALATINA POR INGENIERÍA TISULAR	41
III. GENERACIÓN DE SUSTITUTO PALATINO COMPLETO MULTICAPA CON TEJIDO ÓSEO Y MUCOSA ORAL PALATINA	42
EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL SUSTITUTO PALATINO	43
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	46
ANÁLISIS HISTOLÓGICO	46
CUANTIFICACIÓN HISTOLÓGICA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
RESULTADOS	50
FACTIBILIDAD DE LA TÉCNICA	50
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	50
ANÁLISIS HISTOLÓGICO <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> DE LOS SUSTITUTOS PALATINOS MULTICAPA	53
ANÁLISIS DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN EPITELIAL DEL SUSTITUTO PALATINO MULTICAPA	57
ANÁLISIS HISTOQUÍMICO DEL ESTROMA DEL SUSTITUTO PALATINO MULTICAPA	60

ANÁLISIS HISTOQUÍMICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DEL HUESO PALATINO DEL SUSTITUTO PALATINO MULTICAPA	62
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	79

INTRODUCCIÓN

CARACTERÍSTICAS DEL PALADAR HUMANO

La cavidad oral engloba el área confinada entre el borde libre del bermellón labial, el suelo de la boca, la mucosa bucal y el plano que pasa entre la unión del paladar duro y el blando y la V lingual. El paladar es el techo de esta cavidad y abarca el área arciforme, que se extiende desde el interior de la porción superior de la cresta alveolar, hasta el borde posterior del hueso palatino (Spiegel y Dexheler, 2006).

I. DESARROLLO EMBRIONARIO DEL PALADAR HUMANO

El desarrollo facial empieza de forma temprana durante el desarrollo fetal derivando de células procedentes de la cresta neural. En la cuarta semana, una depresión ectodérmica denominada estomodeo es rodeada por el primer par de arcos branquiales. Las estructuras faciales presentan un desarrollo veloz en las siguientes semanas a partir de 5 primordios o procesos embrionarios de origen mesenquimal (prominencia frontonasal, 2 procesos maxilares y 2 procesos mandibulares).

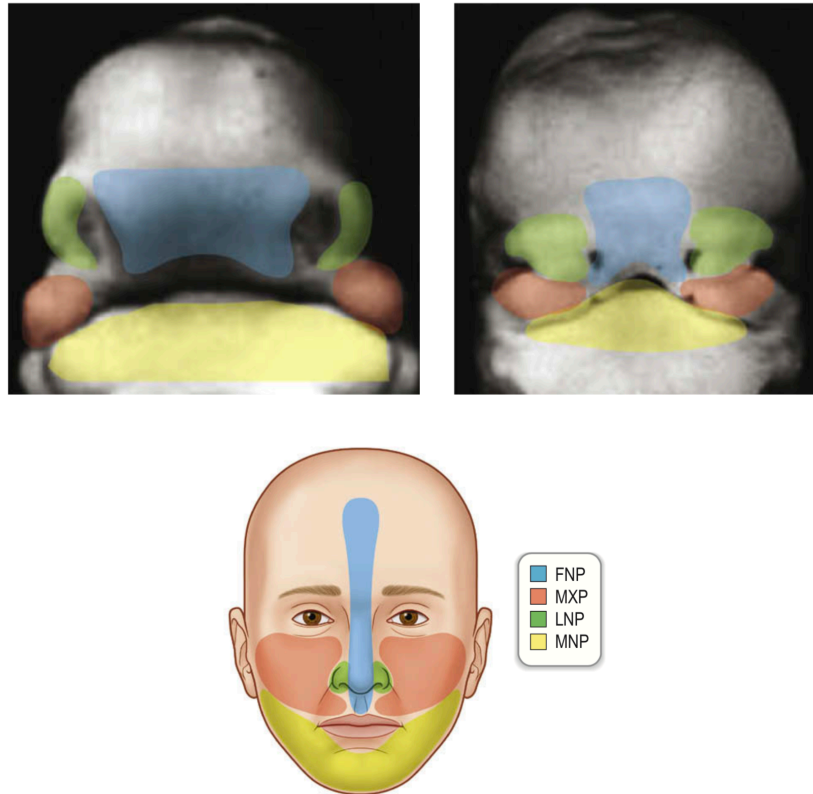


Figura 1. Prominencias faciales. La prominencia frontonasal (FNP) contribuye a la formación del filtrum del labio superior, la columela nasal y el paladar primario. La prominencia maxilar (MXP) regiones laterales facial y labial y al paladar secundario. Las prominencias nasales laterales (LNP) que contribuyen en la formación lateral nasal; y la prominencia mandibular que desarrolla el maxilar inferior (Tomado de Plastic Surgery, 3º Ed. Peter C. Neligan. 2013).

Podemos distinguir dos fases en el desarrollo del paladar:

- Entre la 5º y 6º semana, ambos procesos nasales mediales derivados de la prominencia frontonasal se unen en la línea media para formar el *filtrum* del labio superior, la columela nasal y el paladar primario. Las prominencias maxilares que derivan del

primer arco branquial se unen a los procesos nasales, formando los componentes laterales del labio superior y la cresta alveolar anterior. Alteraciones en esta fase producirán fisuras alveolares y labiales.

- Durante este tiempo, empieza a formarse el paladar secundario (paladar óseo posterior al agujero incisivo y paladar blando). Prominencias desarrolladas desde ambos primordios maxilares se desarrollan y rotan desde una posición vertical para unirse en la línea media tras alcanzar una posición horizontal entre las semanas 8 y 12 de gestación. Alteraciones en esta fase producirán fisuras del paladar secundario (Arosarena, 2007; Pearson y Kirrrschner, 2014).

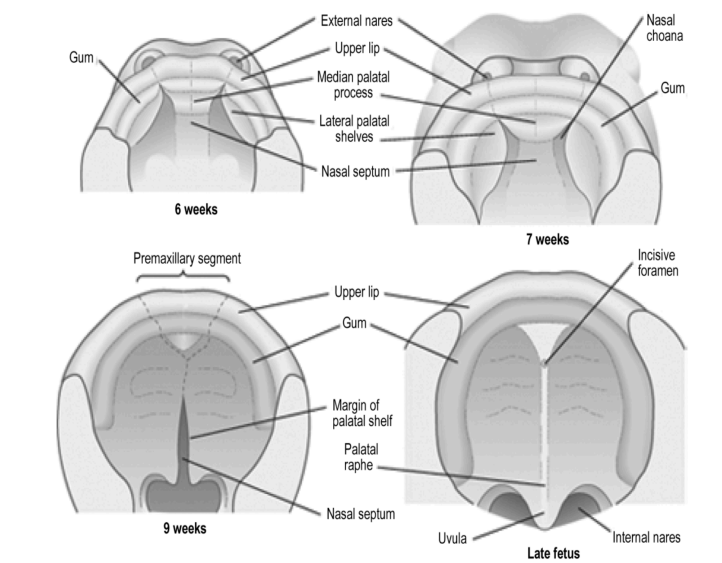


Figura 2. Desarrollo de los paladares primario y secundario (Tomado de Handbook of Craniomaxillofacial Surgery. James E. Zins, Chad R. Gordon. 2014).

II. ANATOMÍA DEL PALADAR HUMANO

En el paladar humano se pueden distinguir el paladar óseo o bóveda palatina (dos tercios anteriores) y el paladar blando o velo del paladar (tercio posterior).

La estructura ósea palatina está conformada por la porción horizontal de los huesos palatinos y los procesos palatinos maxilares, que se unen en la línea media formando el rafe medio. La unión de estos huesos separa la cavidad nasal de la oral. Esta estructura ósea está cubierta por un periostio estrechamente adherido a mucosa. Presenta 3 pares de agujeros palatinos para salida de paquetes vasculo-nerviosos (agujero incisivo con arteria y nervio esfenopalatino y agujeros palatinos mayores y menores con los vasos y nervios palatinos mayores y menores, respectivamente).

ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN MORFOESTRUCTURAL DE UN SUSTITUTO COMPLETO DE PALADAR DURO GENERADO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

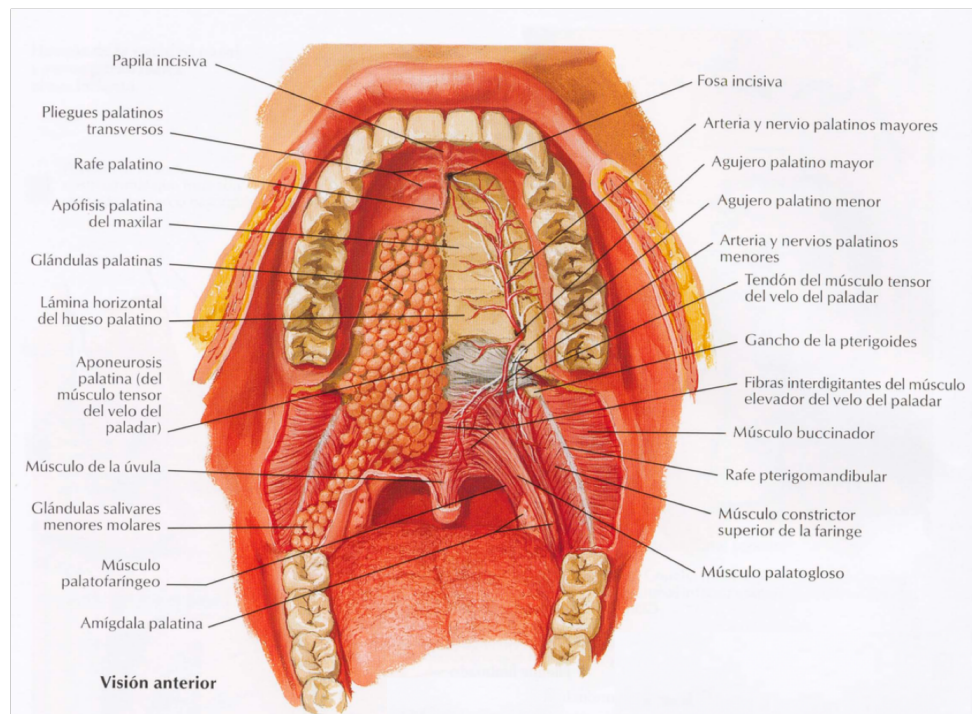


Figura 3. Anatomía del paladar (Tomado de Atlas de Anatomía Humana. Frank H. Netter. 2007).

El paladar blando se describe como un pliegue móvil de una membrana mucosa que se desprende del paladar duro y que envuelve un haz de fibras musculares. Se fusiona a ambos lados con la faringe quedando libre el borde inferior y separa orofaringe de nasofaringe. En el borde posterior, a nivel central, se encuentra una prolongación que se denomina úvula, y lateralmente aparecen dos repliegues que limitan las fosas amigdalinas (pilares anteriores y posteriores del paladar). Tiene función valvular y separa la boca de la faringe y se eleva para aislar las vías nasales durante la deglución y fonación, gracias a los músculos elevadores del paladar que son asistidos por el músculo constrictor de la faringe y el músculo de la úvula (Spiegel y Dexheler, 2006).

La cavidad oral es un área anatómica compleja, en la que la ausencia o la alteración funcional de una estructura puede producir una disfunción importante. La ausencia o resección de una porción del paladar puede desencadenar en una insuficiencia velopalatina o una fístula oronasal que pueden producir alteraciones fonatorias, causando voz nasal y dificultad para la deglución (Isik *et al.*, 2011; Colbert *et al.*, 2015).

III. HISTOLOGÍA DEL PALADAR

A. Histología de la mucosa oral

La totalidad de la cavidad oral, excepto la superficie dental, está revestida por la mucosa oral que está compuesta por epitelio pavimentoso estratificado de origen ectodérmico y una lámina propia (también llamada corion) de tejido conectivo laxo de origen mesenquimal, existiendo en ocasiones una submucosa bajo la lámina propia (Figura 4). La mucosa oral cumple importantes funciones al proteger contra el daño mecánico y la entrada de microorganismos, y ayuda mantener la humedad necesaria gracias a la secreción salivar.

El epitelio es un tejido compuesto por células cuyas principales características son la polaridad y la cohesión, por lo que están firmemente unidas entre sí en ausencia de material extracelular. Al ser avascular, el epitelio se localiza sobre un tejido conectivo subyacente rico en vasos, existiendo una membrana basal entre ambos. Para facilitar la nutrición del epitelio y para favorecer el anclaje a la membrana basal,

aparecen invaginaciones del tejido conectivo (papilas coriales) y evaginaciones epiteliales (crestas epiteliales).

El epitelio de la mucosa oral se compone en un 90% de las células intrínsecas a dicho epitelio (queratinocitos). Otras poblaciones celulares que pueden estar presentes son las células extrínsecas, incluyendo una población permanente o residente de células (células de Merkel, células de Langerhans y melanocitos) y una población de células transitorias (fundamentalmente, células del sistema linfocitario) (Gómez de Ferraris, María; Campos, 2009).

Los queratinocitos se distribuyen, en función del grado de maduración, en diferentes estratos epiteliales:

- Estrato basal o germinativo: situado sobre la lámina basal. Células madre de forma cúbica y pequeño tamaño que presentan núcleo grande y escaso citoplasma.
- Estrato espinoso: formado por varias capas celulares. Presentan un aumento del tamaño y emiten múltiples proyecciones citoplasmáticas.
- Estrato granuloso: células que acumulan múltiples gránulos basófilos de queratohialina.
- Estrato lúcido: células eosinófilas que aumentan progresivamente el estado de queratinización.
- Estrato córneo: células en mayor estado de diferenciación. Conforme aumenta la cantidad de queratina, desaparecen el núcleo y las organelas. Las células del estrato córneo

están ocupadas casi en su totalidad por filamentos de queratina.

El epitelio de la mucosa oral, especialmente los queratinocitos, pueden presentar distinto grado de queratinización en dependencia de su localización y su función. Así, el paladar duro, las encías y la superficie dorsal lingual, al estar expuestos a la acción mecánica, presentan altos niveles de queratinización, formándose incluso un estrato córneo en la superficie (epitelio ortoqueratinizado). Otras zonas de la mucosa oral presentan un epitelio no queratinizado (por ejemplo, la mucosa alveolar) o paraqueratinizado (por ejemplo, en ciertas zonas de la encía y del paladar duro).

La membrana basal separa el epitelio y el corion o lámina propia. Mediante microscopía electrónica de transmisión se distinguen la lámina basal y la lámina reticular. Las funciones de esta membrana son contribuir al anclaje y fijación del epitelio al tejido conectivo, la función de barrera, actuando como filtro químico y físico, y servir de guía en el proceso de cicatrización.

La lámina propia es una lámina de tejido conectivo que proporciona sostén y nutrición al epitelio. La célula principal es el fibroblasto, que mantiene una relación estrecha con los queratinocitos de la capa superior. La secreción de interleuquina 1 (IL1) del queratinocito activado promueve la proliferación y actividad del fibroblasto que, a su vez, segrega prostaglandinas que estimulan la proliferación y diferenciación de los queratinocitos. La matriz

extracelular de la lámina propia es rica en fibras colágenas, elásticas y reticulares que ayudan a mantener la forma del epitelio, así como en componentes no reticulares de la matriz extracelular como los proteoglicanos y las glicoproteínas. A este nivel se encuentra una rica inervación sensorial.

La capa más profunda la compone en ocasiones la submucosa, formada por tejido conectivo laxo, donde encontramos glándulas salivares, vasos, nervios y tejido adiposo. En el rafe medio palatino falta la capa submucosa, por lo que la mucosa está íntimamente adherida al periostio del paladar duro.

En lo que respecta al paladar blando, éste está revestido por epitelio plano estratificado no queratinizado que, a nivel faríngeo, se convierte en epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado. El epitelio plano no estratificado carece de capa córnea y de estrato granuloso. Hay una capa submucosa con abundantes glándulas mucosas en la cara oral y glándulas mucoserosas mixtas en la cara faríngea. La musculatura subyacente es estriada (Geneser, 2003).

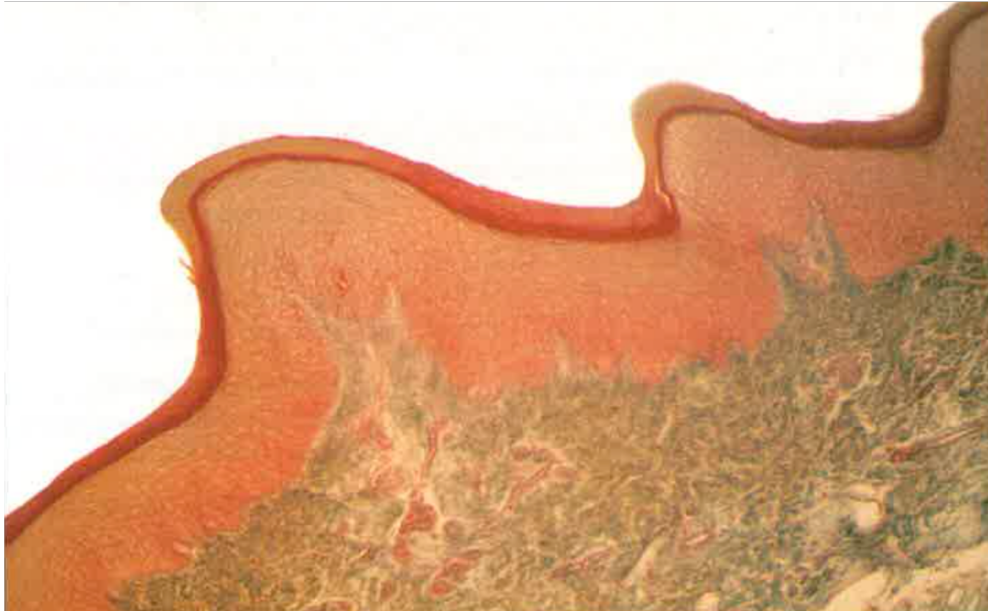


Figura 4. Corte histológico de l paladar a nivel de las rugas palatinas (Tomado de Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. Gómez de Ferraris, María; Campos, Antonio. 2009)

Citoqueratinas y diferenciación epitelial

Las citoqueratinas (CKs) son proteínas de tipo filamento intermedio características de las células epiteliales, aunque no exclusivas de éstas. Su papel principal está asociado con el citoesqueleto intracelular y las uniones intercelulares. Son indispensables para mantener la forma, integridad y morfología celular, así como para la cohesión del tejido epitelial.

Debido a estas funciones, dependiendo del tipo de epitelio que se considere, vamos a encontrar diferente expresión de citoqueratinas específicas. Esto hace que sean consideradas como excelentes patrones

de diferenciación celular, y pueden utilizarse para el diagnóstico de diversas patologías epiteliales, incluyendo el cáncer (Franke *et al.*, 1981; Moll *et al.*, 1982; Garzón *et al.*, 2009).

Hasta el momento, se han descrito alrededor de 23 citoqueratinas diferentes, en función de su peso molecular y sus puntos isoeléctricos. Su expresión suele asociarse a tipos específicos de epitelio, aunque pueden estar presentes en otros tipos epiteliales bajo determinadas circunstancias. Algunos tipos de epitelios tienden a expresar queratinas concretas, habiéndose descrito hasta el momento algunas de ellas:

- El epitelio simple tiende a expresar citoqueratinas 8 y 18.
- El epitelio estratificado expresa fundamentalmente citoqueratinas 5 y 14.
- El epitelio estratificado no queratinizado, como la mucosa geniana, expresa citoqueratinas 4 y 13 en células de la capa suprabasal y citoqueratinas 5 y 14 en las células de la capa basal.
- El epitelio estratificado queratinizado, como las zonas masticatorias de paladar duro, lengua y piel, expresa citoqueratinas 1 y 10 en capas suprabasales junto con 5 y 14 en la capa basal (Raul *et al.*, 2004).

B. Histología del hueso palatino

Los huesos son el principal soporte del cuerpo; aportan una estructura rígida dónde se insertan los músculos, y permiten la transformación de la contracción muscular en movimiento.

La formación del hueso se puede producir por dos vías diferentes: la osificación endocondral (huesos largos, huesos faciales, vértebras y parte lateral de las clavículas, desarrollándose partir de tejido cartilaginoso) y la osificación intramembranosa (huesos bóveda craneal y parte medial de las clavículas, directamente por condensación del mesénquima).

El hueso se compone de diferentes tipos celulares y una matriz orgánica asociada a depósitos mineralizados de hidroxapatita. La matriz orgánica se compone principalmente de colágeno (95%), siendo el resto de los componentes proteoglicanos y proteínas no colágenas.

Morfológicamente, podemos distinguir entre hueso cortical y hueso esponjoso.

- Hueso cortical: la célula principal en el hueso cortical es el osteocito, célula que se encuentra rodeada de matriz mineralizada, aunque también encontramos osteoblastos y osteoclastos. Estructuralmente, el hueso cortical se caracteriza por la presencia de osteonas compuestas por láminas densas en forma de anillos concéntricos alrededor de canales centrales longitudinales por donde discurren vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. Entre estas láminas se encuentran los osteocitos, que se encargan tanto de la síntesis como de la reabsorción de la matriz ósea. Estos osteocitos están unidos entre sí por prolongaciones a través de canalículos.

- Hueso esponjoso: tiene una estructura trabecular. Contiene numerosas laminillas óseas dispuestas en trabéculas cuya estructura laminar es similar a la del hueso cortical, pero que no forma osteonas. Las células fundamentales siguen siendo los osteocitos, osteoblastos y osteoclastos. Entre las trabéculas, encontramos células hematopoyéticas médula ósea y células mesenquimales.

Las diferencias entre ambos tipos de hueso son tanto estructurales como funcionales. El hueso cortical proporciona función mecánica y protectora, mientras que el hueso esponjoso está más relacionado con funciones metabólicas (Geneser, 2003; Meyer y Wiesmann, 2006).

PATOLOGÍA DEL PALADAR HUMANO

Los defectos palatinos pueden ser de diferentes etiologías. Los más frecuentes en la edad pediátrica son los congénitos, como es el caso de la fisura palatina. En la edad adulta podemos encontrar defectos de etiología traumática, infecciosa, postquirúrgica (como la relacionada con las complicaciones tras extracciones dentales), oncológica o defectos causados por la atrofia ósea relacionada con el envejecimiento (Wadsworth y Futran, 2006).

I. PATOLOGÍA CONGÉNITA. FISURA LABIOPALATINA

La fisura labiopalatina es la malformación congénita más frecuente del área craneofacial y se caracteriza por la fusión incompleta de las estructuras de la cavidad oral durante el desarrollo embrionario (Isik *et al.*, 2011; Pearson y Kirrrschner, 2014). Los pacientes afectados, ya sea por fisura labial o por fisura palatina, presentan importantes alteraciones tanto en el ámbito estético y psicosocial como funcional (deglución, succión y fonación) (Arosarena, 2007) y precisan de un tratamiento multidisciplinario para un resultado satisfactorio (Colbert *et al.*, 2015).



Figura 5. Fisura labiopalatina unilateral total izquierda.

En esta patología, se pueden distinguir diferentes grados de afectación. En un 46% de casos, se encuentran alterados tanto el labio como el paladar; un 33%, sólo tienen afectación palatina y el 21% presenta exclusivamente afectación labial (12). (Hanny *et al.*, 2016) Uno de los problemas a resolver en estos pacientes es la corrección del defecto existente a nivel del alveolo o arcada alveolar, la cual sirve de soporte a las piezas dentarias (incisivos y caninos) y está afectada (fisura alveolar) en más de la mitad de los pacientes.

A. EPIDEMIOLOGÍA

Respecto a la incidencia por sexos, se ha descrito que la fisura labial aislada es más frecuente en varones, la fisura palatina aislada es más frecuente en niñas y la patología mixta que afecta a labio y paladar tiende a presentarse por igual en ambos sexos (Arosarena, 2007).

En cuanto a la incidencia de esta malformación en las distintas etnias, diferentes estudios demostraron que en la población caucásica, la incidencia de fisura labio-palatina es de 1 cada 700-1000 nacidos vivos; en asiáticos y nativos americanos, de 1 cada 500, y en personas de etnia africana, la incidencia desciende a 1 cada 2400-2500 nacidos vivos. En el caso de la incidencia de la fisura palatina sin afectación de labio, no se han encontrado diferencias significativas interraciales (Arosarena, 2007; Hanny *et al.*, 2016).

La fisura labiopalatina puede aparecer de forma aislada o asociarse a síndromes y otras anomalías congénitas. Hay más probabilidad de asociación en el caso de afectación del paladar aislado

(42-54%), que en los casos en los que sólo se afecta el labio (14-30%) (Arosarena, 2007; Colbert *et al.*, 2015).

B. ETIOPATOGENIA

La etiología de la fisura labiopalatina se cree que es multifactorial, asociándose la predisposición genética a factores ambientales. El patrón hereditario que presenta no suele ser mendeliano, habiendo discordancias hasta en el 40-60% de los gemelos homocigotos. Aunque aún no se conoce la etiología exacta del problema, hasta la fecha se ha descrito un gran número de alteraciones genéticas que se asocian a esta enfermedad.

Se han hallado diversos factores de crecimiento, receptores, péptidos vasoactivos, proteínas de adhesión celular, componentes extracelulares de la matriz y metaloproteinasas que tienen relación con el desarrollo del paladar. Estas biomoléculas se van expresando en un complejo de tipo cascada estrechamente controlado que, al alterarse por causas genéticas o ambientales, puede resultar en una fisura labiopalatina (Arosarena, 2007; Colbert *et al.*, 2015).

C. TRATAMIENTO DE LA FISURA PALATINA

Los pacientes afectados por fisura labial, palatina, o de ambas, requieren un tratamiento multidisciplinario altamente especializado desde el nacimiento hasta la edad adulta. El tratamiento comienza con el cuidado perinatal y la cirugía primaria, precisando de forma frecuente diversas intervenciones posteriores, así como apoyo por logopedas,

odontólogos, ortodoncistas, otorrinolaringólogos, pediatras, genetistas, etc. (Colbert *et al.*, 2015).

Hasta el momento, se han desarrollado multitud de técnicas quirúrgicas para la corrección de la fisura palatina (Figura 6); en un primer tiempo quirúrgico, se realizan colgajos mucoperiósticos para aislar la cavidad oral de la cavidad nasal y recolocar la musculatura palatina con el fin de mejorar la fonación y deglución. Si la fisura es muy pronunciada, la mucosa disponible puede no ser suficiente para la corrección del defecto, precisando la utilización de injertos dérmicos o mucosos, con resultados subóptimos. El cierre del paladar temprano se relaciona con mejores resultados en la obtención de un lenguaje adecuado (Ito *et al.*, 2006), aunque con mayor incidencia de alteraciones del crecimiento facial. El cierre tardío del paladar se asocia a peores resultados en la fonación, pero a menor alteración del crecimiento del macizo facial.

El cierre del paladar duro se relaciona con alteraciones en el crecimiento maxilar (hipoplasia maxilar) que no aparecen en los pacientes afectados de fisura palatina que no son intervenidos. Diversas causas han sido relacionadas con la hipoplasia maxilar tras la corrección quirúrgica del defecto, como la interrupción del aporte vascular, la retracción cicatricial, la incorporación del periostio a los colgajos, etc., siendo la edad en la que se realiza la corrección lo más determinante (Shi y Losee, 2015; Xu *et al.*, 2015).

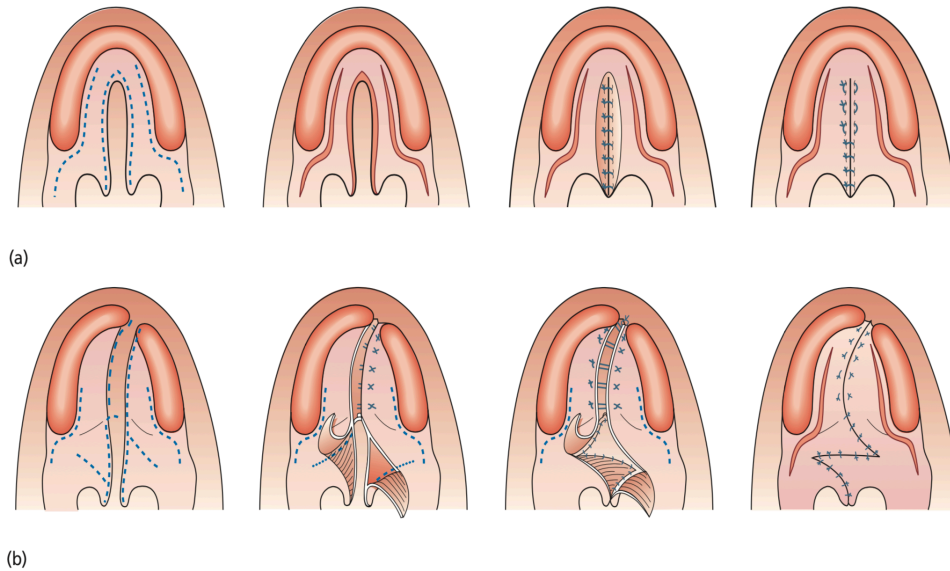


Figura 6. (a)-Esquematación de la técnica de Von Langenbeck utilizada generalmente en la reparación de fisuras del paladar secundario. (b)-Esquematación de la técnica de zetaplastia de Furlow, que muestra la zetaplastia inversa de mucosa y músculo (Tomado de Oral y Maxilofacial Surgery. Lars Andersson. 2010).

Entre los 9 y los 12 años de edad, dependiendo del desarrollo de la raíz del canino, es necesaria la aportación de tejido óseo a nivel de la fisura alveolar (alveoloplastia) (Figura 7), si ésta está presente (Cho-Lee *et al.*, 2013). El uso de injertos óseos mejora los resultados quirúrgicos y permite alcanzar una estética y una función adecuadas (Matsui *et al.*, 2007; Arangio *et al.*, 2008; Semb, 2012). Los injertos óseos cierran la comunicación oronasal, dan soporte al cartílago alar, estabilizan una morfología alveolar adecuada, dan continuidad al arco maxilar y permiten dar soporte a dientes adyacentes facilitando la manipulación ortodóncica, la erupción dental o una rehabilitación protésica posterior cuando estas sean necesarias (Wu y Wang, 2012; Cho-Lee *et al.*, 2013; Bousdras *et al.*, 2015).

Para la obtención de hueso para llevar a cabo la alveoloplastia, se han descrito múltiples zonas donantes de hueso autólogo, siendo el injerto de cresta iliaca el más popular (Matsui *et al.*, 2007; Arangio *et al.*, 2008; Semb, 2012). La incidencia de complicaciones con esta técnica es baja, aunque no está exenta de efectos adversos como dolor, hematomas, seromas o cicatrices hipertróficas en la región donante, y conlleva un aumento de la estancia hospitalaria, especialmente relevante en niños. (Tavakolinejad *et al.*, 2014; Amin *et al.*, 2015; Raposo-Amaral *et al.*, 2015; Muzaffar, Warren y Baker, 2016; Pessoa *et al.*, 2017)

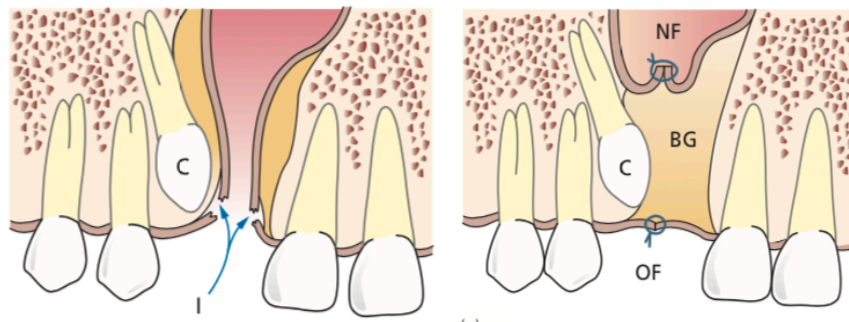


Figura 7. Esquematación de la reparación de la fisura alveolar (alveoloplastia). La zona del defecto óseo (BG) es la zona a injertar con hueso (Tomado de Oral y Maxilofacial Surgery. Lars Andersson. 2010).

II. PATOLOGÍA ADQUIRIDA

La patología adquirida del paladar consiste fundamentalmente en lesiones traumáticas, oncológicas, infecciosas, degenerativas, etc. Su tratamiento es complejo, y actualmente se dispone de diferentes técnicas reconstructivas en función de la extensión del defecto. Pequeños defectos mucosos pueden solucionarse con un cierre primario. Sin embargo, en defectos grandes o moderados, es necesario el aporte de tejidos, siendo un reto reconstructivo los grandes defectos de partes blandas y los que afectan al hueso (Brown y Shaw, 2010).

El manejo reconstructivo ha ido progresando desde el cierre directo, la granulación por segunda intención y los injertos dérmicos, hasta gran variedad de colgajos pediculados e incluso, más recientemente, colgajos microvascularizados (Palmen y Gullane, 2006). Se han descrito multitud de colgajos pediculados, tanto locales como regionales para la corrección de defectos palatinos, como colgajos palatinos, colgajos de septo nasal, colgajos de bola de Bichat, colgajos temporales, colgajos de buccinador y linguales (Rahpeyma y Khajehahmadi, 2015; Seok, Kim y Kim, 2016; Gavin Clavero *et al.*, 2017). Se pueden utilizar colgajos libres microvascularizados, siendo el más descrito para este tipo de defectos el colgajo radial, seguido del colgajo anterolateral de muslo.

Cuando es necesaria la aportación de hueso, los colgajos pediculados más utilizados son el peroneo, el escapular y el de cresta iliaca. La ventaja que aportan los colgajos óseos es la posibilidad de

realizar una rehabilitación protésica implanto-soportada posterior (Brown y Shaw, 2010). Para reconstruir los defectos óseos pequeños del paladar, los injertos autólogos de hueso se consideran la primera opción debido a su capacidad osteogénica, osteoinductiva y osteoconductiva (Azi *et al.*, 2016; Kim, Kim y Moon, 2016).

Otro método tradicional para la reparación palatina es el uso de obturadores protésicos, que aportan dentición y separan la cavidad oral de la nasal. Éstos tienen el inconveniente de no aportar el tejido necesario en muchos casos, dificultades en la retención del dispositivo y de precisar una higiene estricta (Wadsworth y Futran, 2006; Brown y Shaw, 2010).

LA INGENIERÍA TISULAR

La ingeniería tisular permite la construcción de tejidos biológicos artificiales y su utilización médica para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos (Campos Muñoz, 2004). En la mayoría de los casos, la ingeniería tisular se basa en la utilización de tres pilares básicos: las células, los biomateriales y los factores de crecimiento y diferenciación (Langer y Vacanti, 2016).

I. CÉLULAS

Para poder utilizarlas en ingeniería tisular, las células han de ser viables y tener capacidad de proliferación y diferenciación, lo cual convierte a las células madre o células troncales en células ideales para su utilización en ingeniería tisular (Hicok y Hedrick, 2007).

Según su origen, distinguimos distintos tipos de células madre:

- Células madre embrionarias: células pluripotenciales que existen exclusivamente en periodo embrionario y pueden diferenciarse en cualquier tejido del organismo. Se encuentran en el blastocisto.
- Células madre adultas: se encuentran en organismo adulto, feto y cordón umbilical. Pueden ser unipotenciales o multipotenciales, siendo más diferenciadas que las células madre embrionarias y con menor potencial de proliferación y diferenciación que éstas. Las recientes técnicas de transdiferenciación están permitiendo que estas células adultas adquieran capacidades muy similares a las de las células madre embrionarias, especialmente en el caso de las células denominadas iPS (Induced Pluripotent Stem Cells) (Yoshida y Yamanaka, 2017).

Un tipo especial de células madre adultas son las células madre mesenquimales. Estas células fueron obtenidas por primera vez a partir de médula ósea (Weinzierl, Hemprich y Frerich, 2006). Sin embargo, el proceso de obtención de éstas es invasivo y su número y potencial de

diferenciación disminuye con la edad. Estos inconvenientes han provocado la búsqueda de alternativas como la sangre periférica y el tejido óseo. El tejido adiposo es abundante y relativamente sencillo de obtener, siendo el número de células madre que podemos encontrar mayor que en otras zonas del organismo como pueden ser la médula ósea, la piel o el músculo. Una vez obtenidas las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, éstas pueden ser cultivadas y diferenciadas en osteoblastos, que posteriormente podrán producir matriz ósea tanto *in vivo* como *in vitro* (Xu *et al.*, 2005; Weinzierl, Hemprich y Frerich, 2006; Levi *et al.*, 2010; Nieto-Aguilar *et al.*, 2011).

II. BIOMATERIALES

La mayoría de las células de los tejidos generados por ingeniería tisular precisan un soporte que permita reproducir la estructura tridimensional del tejido nativo que se quiere reemplazar. Para ello, se suelen utilizar biomateriales o matrices de origen sintético o natural.

La presencia del componente extracelular juega un papel fundamental en el desarrollo de la mayoría de los tejidos y órganos humanos tanto *in vivo* como *in vitro*, al proporcionar estabilidad mecánica, optimizar la forma y función del tejido y participar en la integración con los tejidos endógenos circundantes (Meyer y Wiesmann, 2006).

Los biomateriales que se utilizan en ingeniería tisular deben cumplir una serie de requisitos para poder ser aplicados de forma

satisfactoria *in vivo*. Estos materiales no deben ser tóxicos y, en el caso de los utilizados en la formación de tejido óseo, deberían ser capaces de inducir osteogénesis tanto en las células implantadas como en los tejidos endógenos circundantes, lo que es conocido como capacidad osteoinductora del material o, al menos, tener capacidad osteoconductora. Los biomateriales no deben inducir una respuesta inmunológica que pudiera impedir una reparación satisfactoria del defecto. Por último, el biomaterial debe tener una apropiada relación entre resistencia mecánica y biodegradabilidad, ya que a menudo, los defectos óseos reparados están expuestos a fuerzas mecánicas significativas inmediatamente tras el implante. Los materiales, por tanto, deben de tener una integridad estructural suficiente para soportar estas fuerzas y, al mismo tiempo, ser altamente biocompatibles (Panetta, Gupta y Longaker, 2009).

III. FACTORES DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN

Junto con las células y los biomateriales, los factores de crecimiento y diferenciación permiten desarrollar tejidos artificiales análogos a los tejidos humanos nativos (tejidos biomiméticos). Su función es fundamental a la hora de inducir la proliferación y la diferenciación celular hacia estirpes específicas del tejido a reproducir, y pueden incluirse en el medio de cultivo o en el biomaterial, aunque son sintetizados y liberados en ocasiones por las propias células que contiene el tejido artificial. Recientemente, diversos autores proponen la utilización de nanopartículas asociadas a distintos factores de

crecimiento para inducir el desarrollo y la maduración de sustitutos de hueso generados mediante ingeniería tisular (De Witte *et al.*, 2018).

IV. INGENIERÍA TISULAR EN TRATAMIENTO DE FISURADOS LABIOPALATINOS

Los avances en ingeniería tisular intentan aportar posibles mejoras en las técnicas actualmente utilizadas en la reparación de defectos óseos, como los que aparecen en el paladar fisurado (Moreau *et al.*, 2007). El objetivo del tratamiento de la fisura palatina, cuando afecta al hueso alveolar, es establecer una continuidad del arco óseo maxilar para alcanzar una anatomía favorable a la rehabilitación dental. Por esto, las mejoras en los materiales usados en los injertos óseos actuales y la búsqueda de nuevos materiales que permitan mejorar los resultados es fundamental para la práctica clínica. El uso experimental de los nuevos materiales requiere establecer previamente un modelo biológico para evaluar su posible potencial clínico. En este sentido, se han propuesto distintos modelos animales para valorar la utilidad de los materiales en su uso en la fisura palatina, incluyendo ratones, ratas, conejos, gatos, cerdos, perros, cabras, ovejas y monos (Kamal *et al.*, 2017).

La utilización de hueso autólogo en la reparación del paladar fisurado aporta una matriz donde las células pueden proliferar, inducir la proliferación de células indiferenciadas y promover su diferenciación a osteoblastos. A pesar de la multitud de estudios que se han publicado sobre la utilización de injertos de diversos materiales, el hueso autólogo

sigue siendo el *gold estándar* (Moreau *et al.*, 2007; Janssen *et al.*, 2014). Los injertos óseos autólogos presentan múltiples ventajas como propiedades osteoconductoras y, en ocasiones, osteoinductivas, actuar como soportes para el crecimiento óseo, inducir la formación ósea y aportar factores osteogénicos, precursores mesenquimales, osteoblastos y osteocitos. Los aloinjertos conservan algunas ventajas, pero pierden la capacidad osteoinductiva y su uso implica la potencial transmisión de enfermedades infecciosas (Pradel y Lauer, 2012; Rahpeyma y Khajehahmadi, 2015; De Ponte *et al.*, 2017; Ge *et al.*, 2017).

Para la obtención de hueso autólogo en la reparación de fisurados palatinos, se han descrito múltiples zonas donantes de hueso autólogo, siendo el injerto de cresta iliaca el más popular (Matsui *et al.*, 2007; Arangio *et al.*, 2008; Semb, 2012). La incidencia de complicaciones con esta técnica es baja, aunque no está exenta de efectos adversos como dolor, hematomas o seromas en la región donante, y conlleva un aumento de la estancia hospitalaria, especialmente en niños (Tavakolinejad *et al.*, 2014; Amin *et al.*, 2015; Raposo-Amaral *et al.*, 2015; Muzaffar, Warren y Baker, 2016; Pessoa *et al.*, 2017). Las técnicas de ingeniería tisular aportan alternativas menos invasivas, con el fin de evitar la morbilidad en la zona donante.

Se han desarrollado varios modelos de tejidos generados por ingeniería tisular para tratar a los pacientes fisurados palatinos, incluyendo tejidos artificiales con base de colágeno y polímeros naturales y sintéticos (Moreau *et al.*, 2007; Panetta, Gupta y Longaker, 2009). Entre los distintos modelos de tejidos artificiales desarrollados

hasta la fecha con posible aplicación en cirugía maxilofacial, se han descrito modelos de hueso artificial basados en materiales mineralizados (Pourebrahim *et al.*, 2013), en hidrogeles no mineralizados (Liceras-Liceras *et al.*, 2017), así como modelos de mucosa palatina artificial basados en materiales de tipo hidrogel (Ophof *et al.*, 2008; Fernández-Valadés-Gámez *et al.*, 2016). Sin embargo, la mayoría de estos estudios aún deben mostrar utilidad clínica en pacientes con fisura labio-palatina.

La traslación clínica de los diferentes modelos de tejido artificial generados hasta el momento revela la necesidad de seguir investigando en el campo y la escasez de modelos capaces de superar los requisitos de los tejidos artificiales para su utilización terapéutica, existiendo limitaciones en los modelos actualmente disponibles (Khojasteh *et al.*, 2015; Bajestan *et al.*, 2017). Algunos estudios en humanos han utilizado células madre como adyuvante para disminuir la reabsorción del injerto óseo autólogo de cresta iliaca (Khojasteh y Sadeghi, 2016), pero este tipo de técnica no evitaría las complicaciones de la zona donante derivadas de la toma del injerto. En otros trabajos, se ha injertado tejido óseo artificial generado por ingeniería tisular para el tratamiento de quistes maxilares, aumento de la altura alveolar y elevación de seno en pacientes edéntulos para rehabilitación protésica, con resultados variables (Ueda *et al.*, 2005; Strietzel, 2006; Pradel *et al.*, 2008; Pradel y Lauer, 2012).

OBJETIVOS

El **Objetivo Principal** de la presente tesis doctoral es el desarrollo mediante ingeniería tisular de un sustituto palatino completo con mucosa palatina y hueso, y evaluación de este tanto *in vivo* como *in vitro*.

Objetivos Específicos:

- Desarrollar un modelo de mucosa palatina mediante ingeniería tisular utilizando biomateriales de fibrina-agarosa.
- Generar un sustituto de hueso palatino a partir de células mesenquimales del tejido adiposo transdiferenciadas a la estirpe osteogénica.
- Elaborar un sustituto completo del paladar duro mediante ingeniería tisular constituido por mucosa palatina utilizando técnicas de biofabricación basadas en nanoestructuración en biorreactor específico.
- Analizar *in vivo* el sustituto completo del paladar duro en animales de experimentación para evaluar su funcionalidad y posible utilidad clínica para la reparación de defectos palatinos.

- Evaluar *in vitro* e *in vivo* el sustituto completo del paladar duro mediante análisis histológico, histoquímico e inmunohistoquímico para determinar los niveles de diferenciación celular y tisular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral hemos diseñado un estudio de experimentación básico de laboratorio con una fase *in vitro* y una fase *in vivo* en animales de experimentación que podría ser la base para una posterior aplicación clínica en pacientes.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En este estudio hemos utilizado 12 conejos machos albinos de la raza Nueva Zelanda de 3 semanas de edad y entre 450 y 500 gramos de peso (momento del destete). Todos los animales fueron mantenidos en la Unidad Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y del Instituto de Investigación IBS.GRANADA, con libre acceso a comida y agua.

El estudio fue aprobado por el comité de ética en experimentación animal (número CEEA03-7-15-307). En todo momento se siguieron las reglas y normas de bienestar animal y el proyecto se ajustó a la regla de las tres R (Liliana, Daniela y Eleonora, 2015).

GENERACIÓN DE CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

Para la obtención de cultivos celulares primarios, a las 3-4 semanas de vida del conejo (destete) se tomaron dos pequeñas biopsias de mucosa oral palatina mediante un *punch* estéril de 3 mm de diámetro y dos biopsias de 1x1cm del tejido adiposo a nivel de ambos pliegues inguinales (Figura 8), suturando con material reabsorbible (*Safil® 4/0*). Estos procedimientos se realizaron bajo anestesia general utilizando inyección intramuscular de Ketamina (25mg/kg de peso) y Xilazina (5mg/kg de peso), y posterior infiltración local de la herida quirúrgica con Bupivacaina 0,25% sin vasoconstrictor.

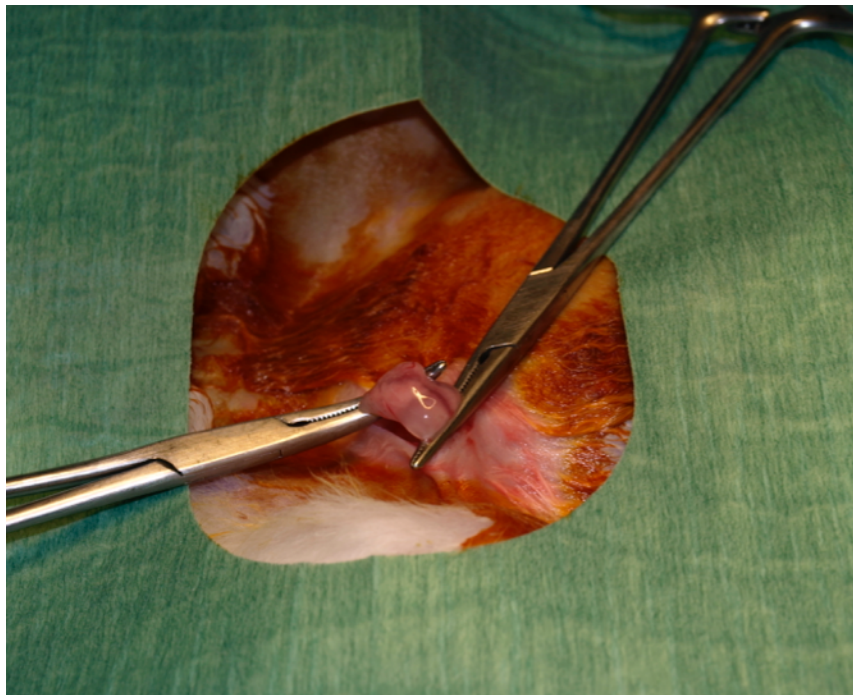


Figura 8. Toma de biopsia de grasa a nivel del pliegue inguinal.

Tras la obtención de las biopsias, las muestras se introdujeron en medio de transporte estéril compuesto por medio de cultivo RPMI suplementado con antibióticos (500U/ml de penicilina y 500µg/ml de estreptomicina) y antimicóticos (1,25µg/ml de anfotericina B), para evitar contaminación de la muestra, y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

En el laboratorio, las muestras se lavaron en PBS (tampón fosfato salino) y se aislaron los fibroblastos de la mucosa oral y las células mesenquimales del tejido adiposo mediante digestión enzimática con una solución de 2mg/ml de colagenasa I de *Clostridium hystoliticum* (Gibco, Karlsruhe, Germany) a 37°C durante 12h. En el caso de la mucosa oral, el remanente epitelial fue posteriormente cultivado como explante para obtener cultivos primarios de queratinocitos orales.

Las células madre mesenquimales del tejido adiposo (AdMSC) y los fibroblastos de la mucosa oral se cultivaron en medio DMEM (*Dubelcco's modified Eagle's medium*; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) suplementado con suero bovino fetal al 10%, antibióticos y antimicóticos (100 U/mL penicilina G, 100mg/mL estreptomicina y 0,25mg/mL de anfotericina B, Sigma-Aldrich).

Los queratinocitos se cultivaron en medio de cultivo epitelial, consistente en una mezcla a 3:1 de medios de cultivo DMEM y Ham-F12 (Sigma-Aldrich), suplementados con suero bovino fetal al 10%, antibióticos y antimicóticos, 24µg/ml de adenina, 0,4mg/ml de hidrocortisona, 5mg/ml de insulina, 10ng/ml de factor de crecimiento

epidérmico, y 1,3ng/ml de triyodotironina, bajo condiciones estándar de cultivo celular.

GENERACIÓN DE UN SUSTITUTO COMPLETO DEL PALADAR DURO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

I. GENERACIÓN DE SUSTITUTO ÓSEO PALATINO POR INGENIERÍA TISULAR

En primer lugar, se procedió a aislar las células AdMSC mediante incubación en una solución de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos, resuspendiéndose 250.000 células en 750µl de DMEM. Tras ello, se generaron hidrogeles de fibrina-agarosa al 0,1% siguiendo protocolos previamente descritos (45). De forma breve, las células resuspendidas en DMEM se mezclan con 7,6ml de plasma humano, 150µl de ácido tranexámico (agente antifibrinolítico), y 500µl de una solución de agarosa tipo VII al 2% en tampón fosfato salino a temperatura de fusión de la agarosa. Para inducir la polimerización del hidrogel, se añadió 1ml de una solución de CaCl₂ al 1%, alicuotándose inmediatamente la mezcla en pocillos de una placa de 6 pocillos. Una vez gelificado el hidrogel 24 horas después, se añadió medio de cultivo inductor específico para diferenciación celular osteogénica (*StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit*). Este medio condicionado e inductor se mantuvo durante 21 días para inducir la diferenciación osteogénica de

las AdMSC, renovándose cada 3 días, según se indica en las instrucciones del fabricante.

II. GENERACIÓN DE SUSTITUTO DE MUCOSA ORAL PALATINA POR INGENIERÍA TISULAR

Para fabricar un sustituto de la mucosa palatina, en primer lugar se generó un sustituto de la lámina propia o estroma de dicha mucosa, fabricándose un epitelio estratificado en la superficie de ésta para obtener una estructura bilaminar con estroma y epitelio análogo a la mucosa oral nativa.

Para la generación del estroma de la mucosa oral palatina, se utilizaron hidrogeles de fibrina-agarosa al 0,1% similares a los utilizados para la generación de hueso, pero que contenían en este caso fibroblastos de la mucosa palatina mantenidos en cultivo. Al igual que en el caso anterior, se tripsinizaron y resuspendieron 250.000 fibroblastos en 750µl de DMEM, mezclándose con 7,6ml de plasma humano, 150µl de ácido tranexámico, 500µl de agarosa tipo VII al 2% y 1ml de CaCl₂ al 1%, alicuotándose inmediatamente la mezcla en pocillos de una placa de 6 pocillos que se cubrieron de medio de cultivo DMEM una vez gelificados.

Tras obtener los sustitutos estromales, se procedió a subcultivar las células epiteliales en la superficie de éstos. Para ello, los queratinocitos mantenidos en cultivo se tripsinizaron, se resuspendieron en DMEM y se subcultivaron sobre los sustitutos estromales (250.000 queratinocitos por hidrogel de una placa de 6

pocillos), siguiendo métodos previamente optimizados (46,47,61,62). Estos sustitutos tisulares se sumergieron en medio de cultivo epitelial durante una semana, aplicándose la técnica de cultivo aire-líquido durante otra semana adicional para inducir la diferenciación y estratificación epitelial. Esta técnica se basa en la utilización de insertos porosos de cultivo *Transwell* (Corning Inc., Nueva York, EEUU) que permiten reducir el nivel del medio de cultivo de modo que los nutrientes sólo puedan alcanzar el epitelio a partir de las capas inferiores.

III. GENERACIÓN DE SUSTITUTO PALATINO COMPLETO MULTICAPA CON TEJIDO ÓSEO Y MUCOSA ORAL PALATINA

Tras la generación del sustituto óseo y del sustituto de mucosa palatina, se aplicaron técnicas de biofabricación utilizando un biorreactor de nanoestructuración (Garzon *et al.*, 2009) para fusionar irreversiblemente ambas estructuras y generar de este modo un sustituto completo del paladar duro (Figura 9).

En primer lugar, el sustituto óseo se colocó sobre una membrana de nylon con poros de $0,22\mu\text{m}$ depositada sobre 5 hojas de papel de filtro absorbente 3MM. Tras ello, se depositó cuidadosamente el sustituto de mucosa oral palatina sobre el sustituto óseo, estando el estroma en contacto directo con el mismo y el epitelio en la capa más superficial. Colocamos posteriormente una malla de nylon de 2mm de luz de malla para proteger el epitelio de la compresión posterior y, sobre ésta, otra

membrana de nylon con poros de $0,22\mu\text{m}$ y 5 hojas de papel de filtro absorbente 3MM. Finalmente se aplica sobre toda la estructura un fragmento de vidrio de 500g de peso durante 3-5min para inducir la compresión plástica de ambos hidrogeles y generar la adhesión del sustituto óseo al sustituto de mucosa oral palatina. Todos estos materiales fueron previamente esterilizados mediante autoclave para mantener la esterilidad para futura aplicación *in vivo*.

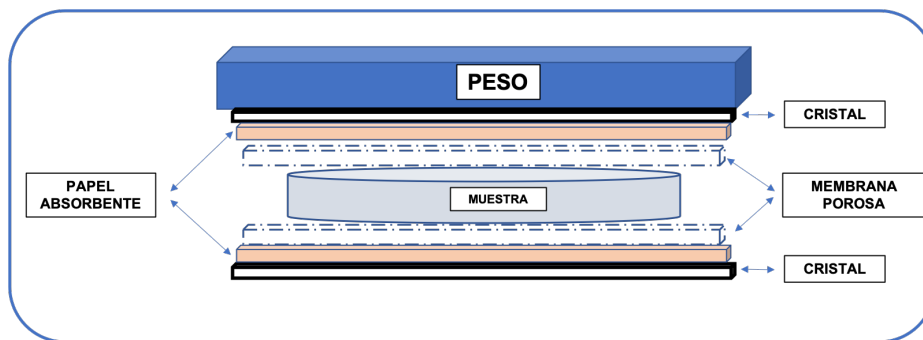


Figura 9. Representación esquemática del biorreactor de nanoestructuración utilizado en la presente Tesis Doctoral.

EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL SUSTITUTO PALATINO

Tras la generación del sustituto palatino multicapa, éste se implantó de forma autóloga en conejos de laboratorio para determinar bioseguridad y eficacia en la reparación palatina.

Para ello, los animales a los que a las 3 semanas de vida se les tomaron biopsias en la parte anterior del paladar y en el pliegue inguinal y que ahora alcanzaban las 7-8 semanas fueron divididos en 3 grupos de estudio de forma aleatoria:

- Grupo I (grupo de estudio). En un primer grupo, se creó un defecto osteomucoso de espesor completo a nivel del lado derecho del paladar, dejándose el lado izquierdo como control. En este defecto se implantó de forma autóloga el sustituto palatino multicapa previamente generado.
- Grupo II (control negativo). En este grupo de animales, se generó el mismo defecto osteomucoso de espesor completo que en el grupo I, dejándose el defecto sin cubrir.
- Grupo III (control positivo). Como control positivo, se estudiaron conejos sin defecto creado en el paladar (animales a los que sólo se les obtuvieron las biopsias).

En los animales de los grupos I y II, se utilizó anestesia general con Ketamina a dosis de 25mg/kg de peso y Xilacina a dosis de 5mg/kg de peso. Posteriormente, se infiltró con anestesia local la zona del paladar duro del lado derecho a nivel del segundo molar. Tras ello, se extirpó un bloque circular de fibromucosa oral palatina de 4mm de diámetro mediante un *punch* quirúrgico estéril, dejando expuesto el hueso subyacente. A continuación, se utilizó una trefina de 4mm de diámetro adaptada a pieza de mano motorizada para extirpar un bloque de hueso, dejando un orificio de 4mm que conectaba con la mucosa nasal intacta a nivel craneal y con la cavidad oral a nivel caudal (Figura 10).



Figura 10. Extirpación de bloque circular de fibromucosa oral palatina de 4mm de diámetro mediante un *punch* quirúrgico estéril y creación de defecto óseo con fresa de trefina de 4 mm en el hemipaladar derecho a nivel del segundo molar.

En los animales del grupo I, este defecto se cubrió con el tejido artificial multicapa generado, colocándose de forma que el sustituto óseo contactara con la mucosa nasal y el epitelio del sustituto de la mucosa oral palatina contactara con la cavidad oral. Para ello, se utilizó sutura reabsorbible de 5/0 de ácido poliglicólico (Braun, Melsungen, Germany).

En todos los casos, el hemipaladar izquierdo permanece sin alteraciones, tomándose como referencia control para cada animal.

En las dos semanas posteriores a la cirugía, la alimentación de todos los animales del estudio consistió en alimento específico para conejos gelificado para evitar la fricción con el implante. Se administró

analgesia postoperatoria en el agua de bebida (Metamizol magnésico 100mg/kg de paso cada 24 horas).

A las 12 semanas de la cirugía, todos los animales fueron sacrificados mediante anestesia general con Ketamina a dosis de 25mg/kg de peso y Xilacina a dosis de 5mg/kg de peso y posterior inyección intracardiaca de cloruro potásico.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Para evaluar la utilidad *in vivo* de los sustitutos completos del paladar, se realizó un análisis morfométrico en todos los animales en el momento del sacrificio. Para ello, se extrajo en bloque el paladar de cada animal, obteniéndose medidas de longitud desde el rafe medio al segundo molar tanto en el lado derecho como en el lado izquierdo utilizando un calibre de precisión digitalizado. Cada medida se realizó tres veces y se halló la media para su análisis. Tras ello, se calculó el porcentaje de la distancia total que correspondía a cada uno de los hemipaladares.

Del mismo modo, se determinó la morfología de la superficie de la mucosa palatina y el efecto a nivel del desarrollo de los molares.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO

En la presente Tesis Doctoral se analizaron histológicamente dos tipos de muestras:

1. Muestras de sustituto palatino multicapa generado en laboratorio (muestras *ex vivo*). Estas muestras se fijaron en formol tamponado y se procesaron de forma rutinaria para su inclusión en parafina.
2. Muestras *in vivo* correspondientes al paladar de los animales de los grupos de estudio I, II y III. En estos casos, se obtuvieron muestras correspondientes al hemipaladar intervenido y al hemipaladar control, las cuales fueron divididas en dos a nivel de la mitad de la zona intervenida (a nivel del segundo molar en el grupo III). Una de estas muestras se utilizó para el estudio de la mucosa oral palatina, por lo que se procedió a extirpar esta estructura del hueso, fijándose en formol e incluyéndose en parafina. La otra muestra se utilizó para el estudio del hueso palatino, por lo que se procedió a su fijación en formol y descalcificación mediante incubación alrededor de 48h en el agente descalcificante Ana Morse, compuesto por una solución al 50% de ácido fórmico y un 20% de citrato sódico en agua destilada. Tras ello, se lavaron en PBS y se procesaron de forma rutinaria para su inclusión en parafina.

Para su inclusión en parafina, cada muestra previamente fijada se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol, se impregnó en xileno y se incluyó en parafina líquida. Tras ello, se obtuvieron secciones de 4-5 μ m de grosor utilizando un micrótopo. Estas secciones fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas utilizando concentraciones decrecientes de etanol.

Para observar la estructura histológica de los tejidos en cada uno de los diferentes grupos de estudio, se realizó un el análisis histológico mediante tinción con hematoxilina-eosina. Brevemente, cada muestra se tiñó con hematoxilina, se lavó en agua, se tiñó con eosina y se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol, impregnándose en xileno y montándose con cubreobjetos para observación histológica.

Para determinar la expresión de citoqueratinas a nivel del epitelio de la mucosa oral palatina y de osteocalcina a nivel del hueso, se realizaron técnicas de inmunohistoquímica. Para ello, se utilizaron usamos anticuerpos primarios anti-CK4 (Sigma-Aldrich), CK13 (Sigma-Aldrich), CK5 (Sigma-Aldrich), CK19 (Máster Diagnóstica, Granada, España) y anti-osteocalcina (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Como anticuerpos secundarios, se utilizó anticuerpos anti-ratón marcados con pigmento fluorescente FITC (para detección de citoqueratinas) o con biotina (para osteocalcina). En el caso de las citoqueratinas, se utilizó medio de montaje con DAPI y el análisis se realizó en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i (Nikon Corp., Tokio, Japón).

Para la determinación de la presencia de proteoglicanos, fibras reticulares, fibras de colágeno y depósitos mineralizados se aplicaron los métodos histoquímicos azul alcian, reticulina de Verhoeff, picrosirius y rojo alizarina, respectivamente, siguiendo protocolos estándar de laboratorio (48) (Oliveira *et al.*, 2013). Todas estas muestras se analizaron en un microscopio Nikon Eclipse 90i utilizando luz blanca (Nikon Corp., Tokio, Japón). En el caso del picrosirius, las fibras de colágeno fueron examinadas bajo luz polarizada y no polarizada.

CUANTIFICACIÓN HISTOLÓGICA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En un primer momento, se tomaron microfotografías de cada tipo de tejido y de cada técnica de tinción. Tras ello, se cuantificó la intensidad de señal de cada tipo de tinción (señal en los colores rojo, verde y azul o RGB) utilizando el software ImageJ (*National Institutes of Health*, EEUU) como se describió previamente (Hendriks, Riesle y Blitterswijk, 2010). De cada muestra, se tomaron 15 medidas en puntos independientes y escogidos aleatoriamente. Tras ello, se calculó el promedio de los resultados de cada muestra eliminando la señal blanca (fondo o *background*) de cada medición. Finalmente, se normalizaron los valores obtenidos en cada caso respecto al control, el cual se consideró como 100% de intensidad de señal. Este método nos permitió determinar la intensidad de tinción de cada muestra como un porcentaje que toma como máximo valor la señal correspondiente al control preestablecido.

La significación estadística se determinó mediante el test de Mann-Whitney para dos muestras independientes (en los casos que comparamos dos grupos de estudio) y el test de Kruskal-Wallis cuando comparamos tres grupos. Para comparar el porcentaje de distancia correspondiente a cada hemipaladar (izquierdo frente a derecho), se utilizó el test exacto de Fischer. Este test se utilizó también para comparar entre sí los porcentajes de distancia obtenidos en los distintos grupos de estudio. Se tomaron como valores estadísticamente significativos aquellos valores de p menores a 0,05 y se realizaron en todo momento pruebas de doble cola.

RESULTADOS

FACTIBILIDAD DE LA TÉCNICA

La aplicación de los protocolos descritos en el apartado Material y Métodos de la presente Tesis Doctoral permitió realizar con éxito la cirugía prevista en los animales. Por un lado, permitió crear un defecto palatino crítico a nivel del paladar óseo y mucoso. Por otro lado, permitió evaluar los nuevos tejidos generados por ingeniería tisular, los cuales pudieron ser implantados satisfactoriamente.

Todos los animales toleraron correctamente tanto la anestesia general como la intervención quirúrgica y el postoperatorio, y no se apreciaron complicaciones o reacciones secundarias al implante del material injertado. La técnica demostró ser factible en todos los animales intervenidos.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Una vez concluido el periodo de seguimiento, se procedió al sacrificio de los animales y al análisis morfométrico de la fibromucosa palatina mediante la determinación macroscópica de la distancia existente desde el rafe medio hasta el segundo molar en ambos hemipaladares.

Dicho análisis reveló, en primer lugar, que ambos hemipaladares presentaban medidas similares en el grupo control positivo (animales no intervenidos, Figura 11.A), con un 50,2% de la longitud total del paladar correspondiente al lado izquierdo y un 49,8% en el lado derecho. Las diferencias fueron no significativas ($p>0,05$) y la longitud del hemipaladar derecho equivalía a un 99,2% de la longitud del hemipaladar izquierdo.

Sin embargo, cuando se analizó el control negativo (animales a los que se les realizó un defecto osteo-mucoso palatino en el lado derecho que no fue reparado, Figura 11.B), se encontró que la longitud del hemipaladar izquierdo (lado control) correspondió al 59,6% de la longitud total del paladar (distancia total entre los dos segundos molares). Sin embargo, el hemipaladar derecho (lado intervenido) correspondía al 40,4% de la longitud total del paladar y su longitud equivalía al 67,9% de la longitud del hemipaladar control. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,0071$).

En el grupo de estudio (defecto creado y reconstruido con el sustituto palatino multicapa generado por ingeniería tisular, Figura 11.C), el análisis morfométrico reveló escasas diferencias en la longitud del hemipaladar derecho y del izquierdo. En concreto, el hemipaladar izquierdo (lado control) correspondió al 50,1% de la longitud total del paladar, mientras que la del derecho (lado intervenido) correspondió al 49,9% de dicha longitud. El lado intervenido correspondía al 99,4% de la longitud del lado control y las diferencias no resultaron significativas ($p>0,05$).

La comparación de los distintos grupos entre sí mostró que la longitud del lado intervenido fue significativamente inferior en el control negativo que en el control positivo ($p=0,0001$) y en el control negativo que en el grupo de estudio ($p=0,0001$). Sin embargo, los valores obtenidos en el grupo de estudio fueron similares a los del control positivo no intervenido ($p>0,05$).

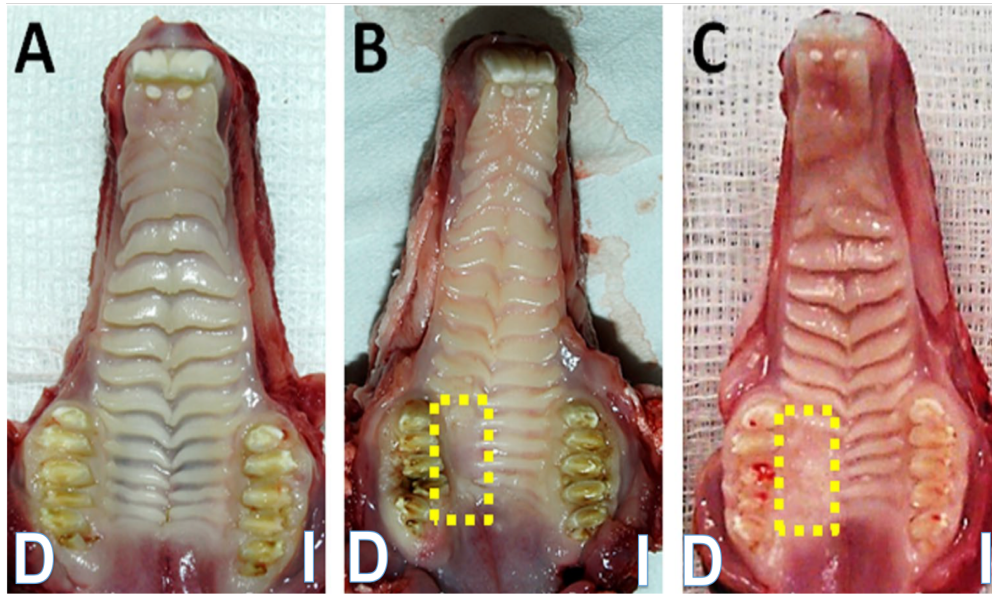


Figura 11. Vista macroscópica de los tejidos blandos del paladar (D, lado derecho; I, lado izquierdo) en cada grupo de estudio. A. Control positivo (sin intervención). B. Control negativo (defecto no reparado). C. Grupo de estudio (defecto reparado con sustituto palatino multicapa). El lugar del defecto creado/injerto es señalado con punteado rectangular.

ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN MORFOESTRUCTURAL DE UN SUSTITUTO COMPLETO DE PALADAR DURO GENERADO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

	Lado izquierdo	Lado derecho	% Lado derecho	Valor de p
Control positivo (CP)	50,2	49,8	99,2	>0,05
Control negativo (CN)	59,6	40,4	67,9	0,0071*
Grupo estudio (GE)	50,1	49,9	99,4	>0,05
CP vs CN				p=0,0001*
CP vs CE				P>0,05
CN vs CE				P=0,0001*

Tabla 1. Análisis morfométrico del paladar de los conejos. Control positivo (CP, conejos no intervenidos), control negativo (CN, defecto no reparado) y grupo de estudio (GE, defecto reparado con sustituto palatino multicapa (SPM)).

ANÁLISIS HISTOLÓGICO IN VIVO E IN VITRO DE LOS SUSTITUTOS PALATINOS MULTICAPA

El análisis histológico *in vitro* del sustituto palatino multicapa utilizando la tinción de hematoxilina-eosina (Figura 12), reveló la presencia de una estructura histológica trilaminar compuesta por tres capas:

- La capa más externa o superficial (sustituto epitelial) consiste en 3-4 capas de queratinocitos. Aunque el epitelio estuvo expuesto a la técnica aire-líquido, no se observan signos de queratinización terminal. Además, no se observan ni papilas coriónicas ni crestas epiteliales.

- La capa media (sustituto estromal) se compone principalmente de fibras del biomaterial de fibrina-agarosa y células dispersas.
- La capa más interna (sustituto óseo) está constituida por una matriz fibrilar densa que contiene numerosas células.

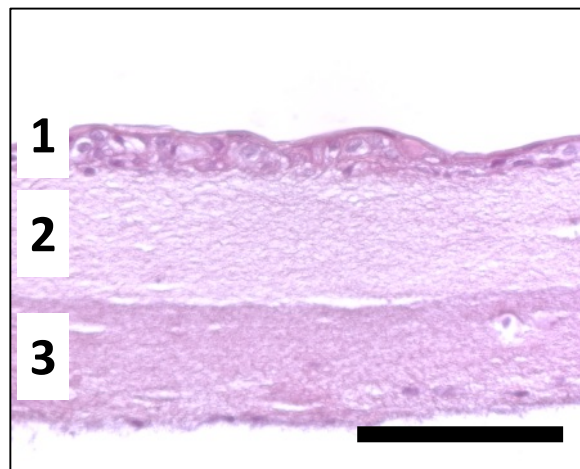


Figura 12. Evaluación estructural histológica del sustituto palatino multicapa (SPM) generado en laboratorio previamente a su implante en animales de laboratorio. Barra de escala a 100µm Las capas tisulares están marcadas con números (1, Sustituto epitelial. 2, Sustituto estromal. 3, Sustituto óseo).

Cuando se analizó el paladar de los animales no intervenidos (control positivo), se encontró una estructura trilaminar formada por las siguientes capas:

- Una capa superficial constituida por un epitelio pavimentoso estratificado bien diferenciado con numerosas crestas y papilas y un gran número de estratos

celulares en los que se diferenciaban claramente los estratos basal, espinoso, granuloso y córneo (Figura 13).

- Una capa intermedia correspondiente al corion o estroma en el que se aprecia una densa matriz extracelular vascular con numerosas células de tipo fibroblástico inmersas en su interior.
- Una capa interna correspondiente al hueso palatino bien configurado con osteocitos inmersos en una matriz extracelular muy densa.

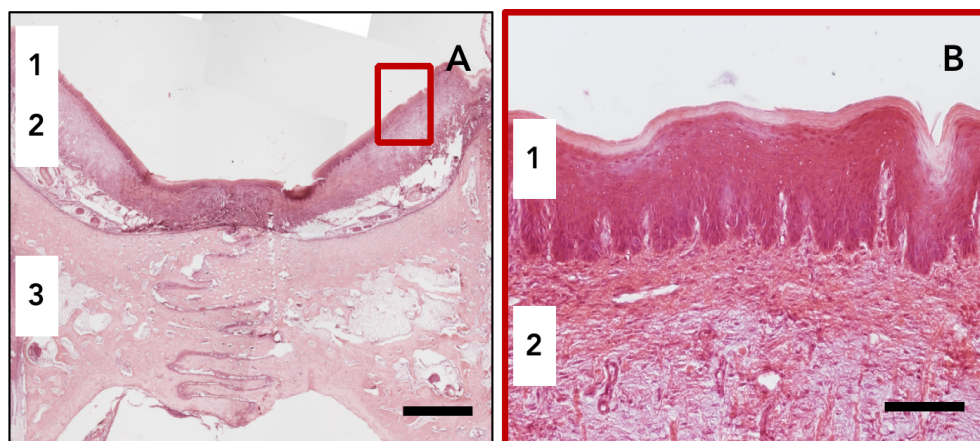


Figura 13. A, Evaluación morfológica y estructural del paladar del conejo control. B, Magnificación del área marcada en rojo en (A). Barra de escala a 100 μ m en (B) y a 1mm en (A). Las capas tisulares están marcadas con números en capa imagen (1 epitelio; 2 estroma; 3 hueso).

El análisis *in vivo* del tejido palatino injertado en conejos de laboratorio (grupo de estudio), mostró importantes diferencias respecto al tejido mantenido en cultivo (*in vitro*). En general, el sustituto palatino

multicapa implantado in vivo mostró las siguientes capas o estratos tisulares:

- A nivel de la superficie del sustituto implantado (hemipaladar derecho), se observó un epitelio estratificado de tipo pavimentoso bien configurado constituido por alrededor de 20 estratos celulares en el hemipaladar derecho. En el lado izquierdo (no operado), sin embargo, encontramos un epitelio formado por un número claramente mayor de estratos celulares. En ambos casos, se aprecia una capa basal, un estrato espinoso, un estrato granuloso y un estrato córneo, así como abundantes crestas epiteliales y papilas coriónicas, aunque las encontramos en menos cantidad en el lado operado que en el lado control (Figura 14).
- La capa estromal estaba constituida por una densa matriz extracelular bien organizada con abundantes células y vasos sanguíneos muy similar al que se encontró en el hemipaladar izquierdo utilizado como control.
- La capa ósea presentó una estructura homogénea con abundantes células de tipo osteoblasto inmersas en una matriz extracelular muy densa que no presentaba diferencias apreciables respecto al lado control.

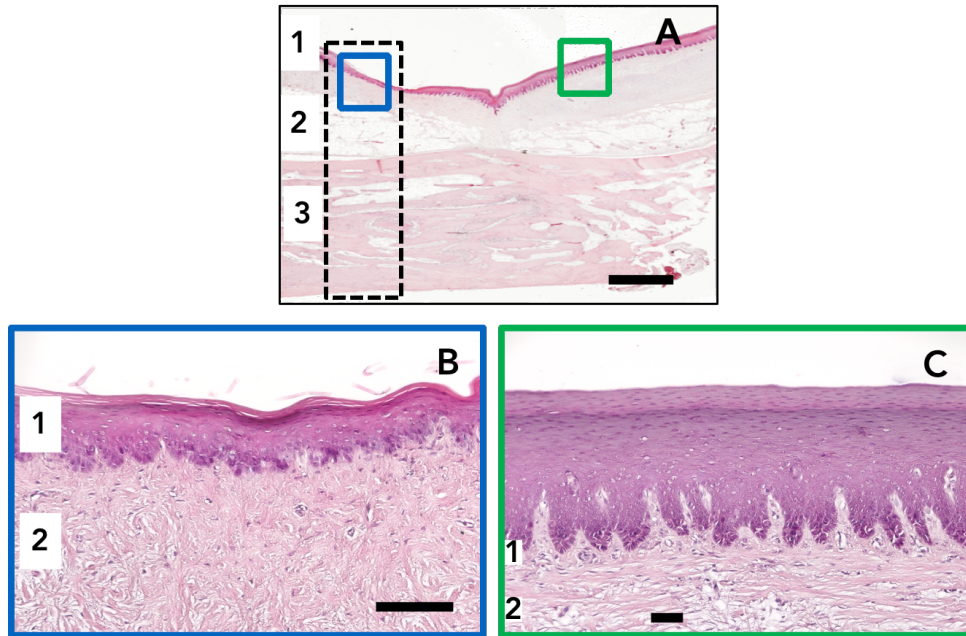


Figura 14. Evaluación morfológica y estructural del sustituto palatino multicapa (SPM) *in vivo*. **A**, Evaluación *in vivo* del sustituto palatino multicapa injertado en el grupo de estudio (GE). El lugar del injerto está marcado con punteado cuadrangular. **B**, Tejido injertado señalado en azul en (A). **C**, Control de tejido no injertado tomado del mismo animal (señalado en verde en (A)). Barras de escala a 100 μ m en (B), (C) y a 1mm en (A). Las capas tisulares están marcadas con números en capa imagen (1 epitelio; 2 estroma; 3 hueso).

ANÁLISIS DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN EPITELIAL DEL SUSTITUTO PALATINO MULTICAPA

El análisis de citoqueratinas, las proteínas más características del tejido epitelial, nos permitió determinar niveles de diferenciación celular en los distintos tejidos analizados en la presente Tesis Doctoral (Tabla 2 y Figura 15).

En primer lugar, este análisis reveló que las citoqueratinas CK4 y CK13 eran intensamente positivas en todas las capas epiteliales de los sustitutos palatinos generados en laboratorio y mantenidos *in vitro*. Sin embargo, en el sustituto palatino injertado en el paladar de los conejos de laboratorio (grupo de estudio), la expresión de estos marcadores fue débilmente positiva, y las señales positivas se encontraron restringidas a las capas más apicales del epitelio. Las muestras correspondientes a los controles positivos (animales no intervenidos), mostraron asimismo expresión de CK4 y CK13 restringida a las capas más superficiales del epitelio, aunque la intensidad de expresión fue significativamente mayor en comparación con el grupo de estudio. En segundo lugar, el análisis de expresión de citoqueratina CK5 demostró ausencia de esta proteína en las muestras mantenidas *in vitro*. Sin embargo, CK5 resultó débilmente positiva en las capas más apicales del epitelio del grupo control e intensamente positiva en las capas apicales del epitelio de las muestras control. Finalmente, la expresión de la citoqueratina CK19 resultó intensamente positiva en las capas suprabasales de las muestras *in vitro*, siendo su expresión significativamente menor y restringida a las capas más apicales en el epitelio de las muestras injertadas *in vivo* en el grupo de estudio. En la mucosa oral control se encontró señal intensamente positiva de CK19 en las capas suprabasales, con mayor expresión en el estrato celular apical.

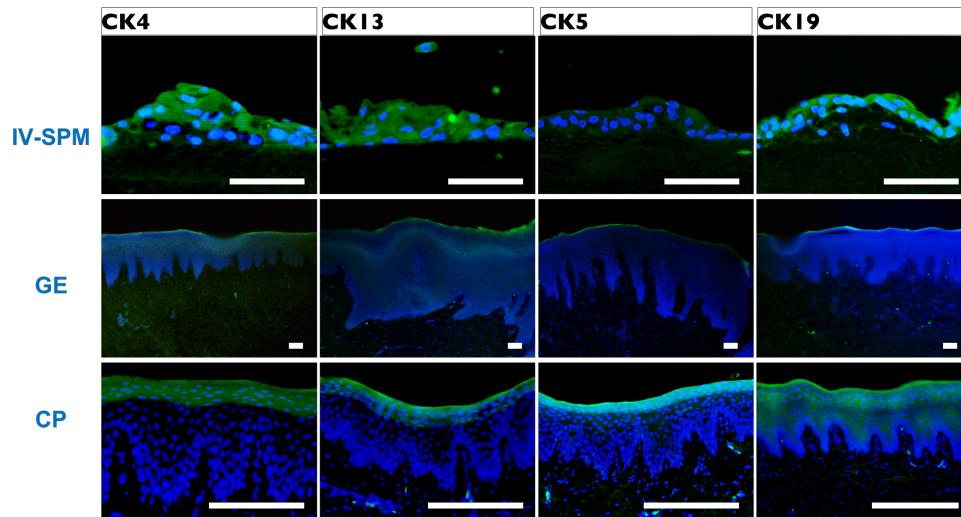


Figura 15. Análisis con inmunofluorescencia de la expresión de citoqueratinas en la capa epitelial de los controles y los animales del grupo de estudio. La expresión de las citoqueratinas CK4, CK13, CK5 y CK19 corresponde a la señal verde. **IV-SPM**, sustituto palatino multicapa *in vitro*. **GE**: sustituto palatino multicapa injertado en los animales del grupo de estudio. **CP**: grupo control positivo. Barra de escala: 50µm.

	CK4	CK13	CK5	CK19
<i>In Vitro</i> (iv-SPM)	+++ ^{1,2,3}	+++ ^{1,2,3}	-	+++ ^{1,2}
Grupo estudio (GE)	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
Control positivo (CP)	+++ ¹	+++ ¹	+++ ¹	+++ ^{1,2}

Tabla 2. Análisis semicuantitativo de la inmunofluorescencia *in vitro* (**iv-SPM**) e *in vivo* (**GE**) del sustituto palatino multicapa y del epitelio palatino del grupo control (**CP**) determinado por inmunohistoquímica para diferentes citoqueratinas. ¹capas apicales del epitelio. ²capas medias del epitelio. ³capas basales del epitelio.

ANÁLISIS HISTOQUÍMICO DEL ESTROMA DEL SUSTITUTO PALATINO MULTICAPA

En primer lugar, el análisis histoquímico de la presencia de proteoglicanos determinada mediante el método histoquímico de azul alcian mostró muy poca presencia de estos componentes en el estroma de las muestras mantenidas in vitro. Por el contrario, el estroma de la mucosa palatina no sometida a intervención (controles positivos) mostró intensa señal histoquímica para estos componentes. El análisis de los hemipaladares en los que se injertó el sustituto multicapa de paladar mostró señal histoquímica superior a la de las muestras in vitro pero que no alcanzó los niveles del paladar control. Las diferencias entre los distintos grupos de estudio fueron estadísticamente significativas (Tabla 3 y Figura 16).

En segundo lugar, el análisis histoquímico para fibras elásticas utilizando la técnica de Verhoeff mostró escasa presencia de estos componentes fibrilares de la matriz extracelular en todas las muestras, siendo las muestras de paladar control las que presentaban mayor abundancia de estas fibras y las muestras mantenidas in vitro las que presentaban menor cantidad de fibras elásticas. Las diferencias entre los distintos grupos de estudio fueron estadísticamente significativas (Tabla 3 y Figura 16).

Por otra parte, el análisis de fibras de colágeno mediante la técnica histoquímica de picrosirius reveló gran cantidad de estas fibras en los controles de paladar no intervenido, siendo muy escasas en las muestras

mantenidas *in vitro*. Las muestras de sustituto palatino multicapa implantadas *in vivo* presentaron niveles de colágeno equivalentes a aproximadamente la mitad que en los controles. Las diferencias entre los distintos grupos de estudio fueron estadísticamente significativas (Tabla 3 y Figura 16). El análisis de los resultados utilizando luz polarizada confirmó la mayor presencia de fibras maduras de colágeno en los controles y una mayor orientación de estas fibras en comparación con las muestras del grupo de estudio.

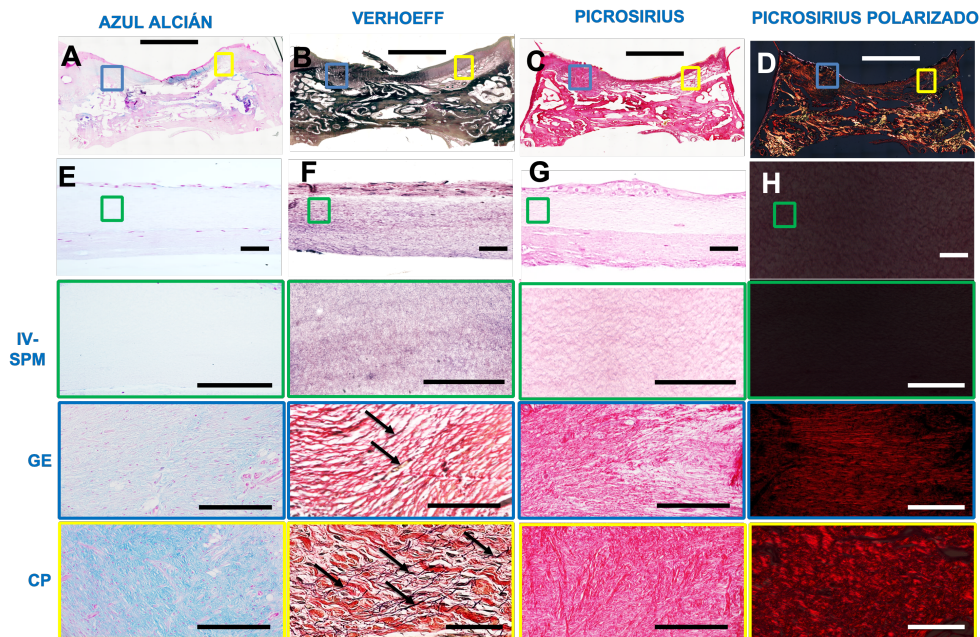


Figura 16. Análisis histológico del estroma de los sustitutos palatinos multicapa mantenidos *in vitro* (IV-SPM) e *in vivo* (GE) y en tejido palatino control (CP). Se muestra el análisis de la presencia de proteoglicanos (A, E), fibras elásticas (B, F) y fibras de colágeno (C, D, G, H) mediante tinción de azul alcian, Verhoeff y picosirius (polarizado y no polarizado). Los recuadros señalan el área magnificada para cada grupo en color

verde (**IV-SPM**), azul (**GE**) y amarillo (**CP**). Barra de escala a 5mm (A-D) y a 50 μ m (resto de las fotografías).

	IV-SMP	Grupo Estudio (GE)	Control positivo (CP)	IV vs GE	IV vs CP	GE vs CP	IV vs GE vs CP
ESTROMA MUCOSA ORAL							
Azul Alcían	36,95 \pm 3,27	73,91 \pm 23,44	100 \pm 17,96	0,00150*	0,00001*	0,01150*	0,00006*
Verhoeff	22,16 \pm 13,70	48,46 \pm 26,55	100 \pm 25,24	0,01150*	0,00150*	0,00105*	0,00044*
Picosirius	13,91 \pm 6,58	48,46 \pm 29,19	100 \pm 30,60	0,01854*	0,00001*	0,00209*	0,00016*

Tabla 3. Análisis cuantitativo de los componentes relevantes del estroma de la mucosa oral in vitro (**iv-SMP**) e in vivo (**GE**) del sustituto palatino multicapa (**SPM**), y del paladar del grupo control positivo (**CP**), determinados por histoquímica e inmunohistoquímica. Para cada método los resultados muestran la media \pm la desviación estándar de cada muestra. Las columnas de la derecha muestran el valor p de la comparación por parejas de las muestras con el test de Mann-Whitney, y la comparación global de las tres muestras con el test de Kruskal-Wallis. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas con *.

ANÁLISIS HISTOQUÍMICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DEL HUESO PALATINO DEL SUSTITUTO PALATINO MULTICAPA

Para determinar la presencia de componentes fundamentales de la matriz extracelular en el tejido óseo de los sustitutos tisulares generados en esta Tesis Doctoral, se utilizaron distintos métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos.

En primer lugar, el análisis de componentes mineralizados de la matriz extracelular utilizando rojo alizarina reveló la presencia de depósitos mineralizados en la capa correspondiente al sustituto óseo de

las muestras mantenidas in vitro, aunque la cuantificación de estos componentes fue inferior a la que se encontró en el hueso palatino de los controles positivos no intervenidos. Los sustitutos palatinos multicapa mostraron señal positiva superior a la de las muestras in vitro, pero inferior a la de los controles. Las diferencias entre los distintos grupos de estudio fueron estadísticamente significativas (Tabla 4 y Figura 17).

En segundo lugar, el análisis inmunohistoquímico de la presencia de osteocalcina reveló la escasa señal encontrada para este marcador óseo en las muestras mantenidas in vitro, la cual aumentó una vez implantado in vivo, aunque sin alcanzar los niveles de los controles. Las diferencias entre los distintos grupos de estudio fueron estadísticamente significativas (Tabla 4 y Figura 17).

Finalmente, el análisis de fibras de colágeno utilizando la técnica histoquímica de picosirius en el sustituto óseo del tejido artificial reveló que la intensidad de colágeno en esta capa de los sustitutos palatinos multicapa fue inferior a la de los controles de hueso no intervenido. Sin embargo, los sustitutos palatinos multicapa implantados en el grupo de estudio mostraron niveles similares de expresión de colágeno que los controles positivos. Las diferencias entre los sustitutos mantenidos in vitro y los grupos de estudio y control fueron estadísticamente significativas, pero no hubo diferencias entre el grupo de estudio y el grupo control positivo (Tabla 4 y Figura 17).

ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN MORFOESTRUCTURAL DE UN SUSTITUTO COMPLETO DE PALADAR DURO GENERADO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

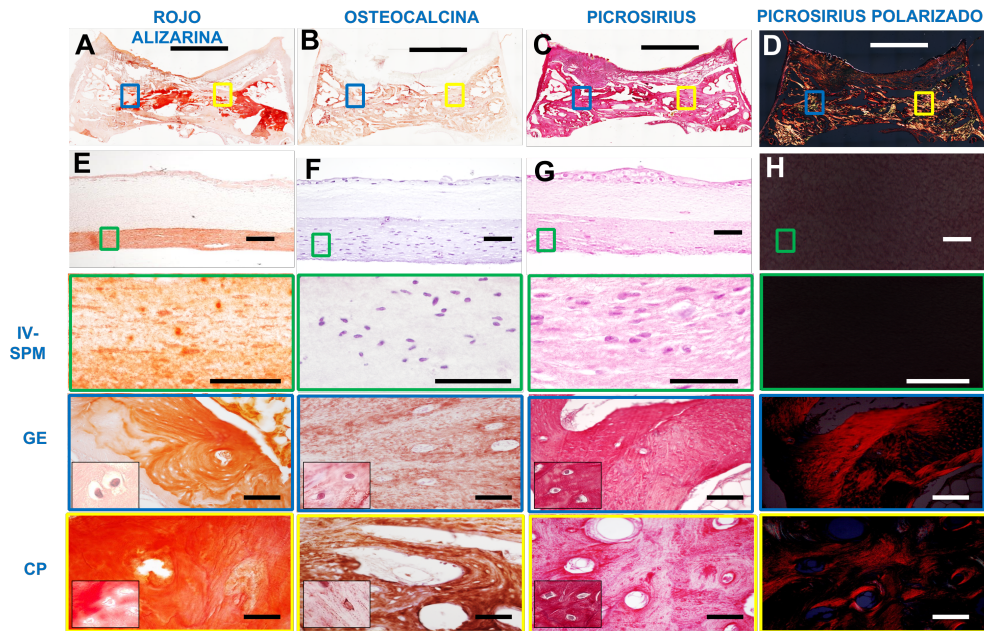


Figura 17. Análisis histoquímico e inmunohistoquímico del hueso de los sustitutos palatinos multicapa mantenidos *in vitro* (IV-SPM) e *in vivo* (GE) y en tejido palatino control (CP). Se muestra el análisis de la presencia de mineralización (A, E), osteocalcina (B, F) y fibras de colágeno (C, D, G, H) mediante tinción de rojo alizarina, inmunohistoquímica para osteocalcina y picrosirius (polarizado y no polarizado). Los recuadros señalan el área magnificada para cada grupo en color verde (IV-SPM), azul (GE) y amarillo (CP). Barra de escala a 5mm (A-D) y a 50 μ m (resto de las fotografías).

	IV-SMP	Grupo Estudio (GE)	Control positivo (CP)	IV vs GE	IV vs CP	GE vs CP	IV vs GE vs CP
HUESO							
Rojo Alizarín	43,99±9,49	78,52±13,65	100±7,34	0,00004*	0,00001*	0,00008*	0,00000*
Osteocalcina	15,81±2,61	55,86±12,02	100±16,96	0,00001*	0,00001*	0,00008*	0,00000*
Picosirius	29,53±11,70	109,55±28,29	100±36,89	0,00001*	0,00001*	0,57874	0,00006*

Tabla 4. Análisis cuantitativo de los componentes relevantes del hueso in vitro (**iv-SMP**) e in vivo (**GE**) del sustituto palatino multicapa (**SPM**), y del paladar del grupo control positivo (**CP**), determinados por histoquímica e inmunohistoquímica. Para cada método los resultados muestran la media ± la desviación estándar de cada muestra. Las columnas de la derecha muestran el valor p de la comparación por parejas de las muestras con el test de Mann-Whitney, y la comparación global de las tres muestras con el test de Kruskal-Wallis. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas con *.

DISCUSIÓN

El tratamiento de la fisura labiopalatina requiere a menudo múltiples intervenciones quirúrgicas que pueden dar lugar a alteraciones del crecimiento maxilofacial y otras complicaciones (Tavakolinejad *et al.*, 2014). Uno de los problemas más importantes a los que se enfrenta la cirugía reconstructiva de la fisura labiopalatina es la falta de tejido sano que permita una reparación eficiente del paladar para aislar la cavidad oral de la nasal. Además, la fisura alveolar es un defecto osteomucoso que se presenta hasta en el 75% de los pacientes afectados de fisura labiopalatina (Cho-Lee *et al.*, 2013), precisando para su reparación el uso de injertos óseos en la intervención denominada alveoloplastia. La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo contribuir a la búsqueda de nuevas soluciones que posibiliten un tratamiento más eficaz y regenerativo de esta patología, disminuyendo sus complicaciones.

A este respecto, la ingeniería tisular es un área de investigación biomédica que ha logrado desarrollar en los últimos años un gran número de tejidos y órganos para uso clínico, lo que ha permitido la creación, entre otros, de córnea, piel, mucosa oral, nervio y tejido óseo a partir de pequeñas biopsias de los tejidos que se quieren reproducir o de células madre de origen mesenquimal (Nieto-Aguilar *et al.*, 2011; Stanko *et al.*, 2013; Fernández-Valadés-Gámez *et al.*, 2016; Tong *et al.*, 2016).

Estudios realizados en animales de experimentación sugieren que el tejido óseo obtenido mediante ingeniería tisular puede ser una alternativa válida para el tratamiento de pacientes con defectos palatinos, aunque aún es necesario seguir investigando en este campo (Pourebrahim *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2015; Liceras-Liceras *et al.*, 2017).

Aunque se han logrado resultados satisfactorios en lo que se refiere a la construcción de tejidos simples mediante ingeniería de tejidos, la generación de estructuras complejas constituidas por diferentes tejidos como es el caso del paladar continúa sin resolverse de forma satisfactoria.

En la presente Tesis Doctoral describimos la fabricación de un sustituto multicapa de paladar duro en un modelo compuesto de conejo de laboratorio que, por primera vez, se compone de tres tejidos distintos generados por ingeniería tisular y perfectamente integrados (y no meramente apuestos): epitelio de mucosa oral, estroma de mucosa oral y hueso palatino. Al integrar la mayor parte de los componentes del paladar duro, este modelo aporta una estructura más anatómica y funcional y ofrece una nueva herramienta terapéutica para la reparación del paladar. Además, debido a su naturaleza biomimética del tejido a reparar, este modelo podría contribuir a la prevención de alteraciones en el desarrollo facial. Para ello, nuestro grupo de investigación utilizó técnicas de nanoestructuración basadas en métodos de compresión plástica previamente descritos por Robert Brown (Cheema y Brown, 2013).

Hasta ahora, algunos estudios describen la generación de materiales multicapa consistentes en varios estratos del mismo biomaterial o del mismo tejido (Silva *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2017), pero no existen trabajos que describan la fusión de distintos tejidos para generar una estructura compleja e integrada como la que se describe en la presente Tesis Doctoral. Por otro lado, la utilización de impresoras 3D podría contribuir a la fabricación de tejidos complejos (Murphy y Atala, 2014; Kačarević, 2018; You *et al.*, 2018), pero, hasta la fecha, esta tecnología no se ha podido aplicar a estructuras tan complejas como el paladar duro, en el que existe tejido óseo, tejido conectivo y epitelio estratificado, los cuales deben estar perfectamente integrados. Con la nanoestructuración, técnica descrita inicialmente para la generación de tejidos más simples, hemos podido fusionar eficientemente distintas estructuras generadas mediante ingeniería tisular (una mucosa oral con epitelio y estroma y un sustituto óseo) para obtener un sustituto multicapa del paladar duro. Aunque el mecanismo íntimo de la nanoestructuración aún no es bien conocido, trabajos previos sugieren que la combinación de fuerzas de compresión y de deshidratación controlada induce la formación de enlaces intermoleculares entre los biomateriales de las distintas estructuras implicadas para generar una nueva estructura compuesta que podría ser clínicamente útil (Scionti *et al.*, 2014).

El análisis del sustituto palatino multicapa generado en la presente Tesis Doctoral reveló la presencia de los tres tejidos que componen el paladar duro, los cuales presentaban una estructura histológica análoga a la de los tejidos nativos, con una perfecta

integración entre las tres capas. Sin embargo, existían diferencias en el grado de diferenciación de los distintos tejidos que lo componen. A este respecto, numerosos estudios previos demostraron que los tejidos artificiales generados en laboratorio presentan bajos niveles de diferenciación celular mientras se mantienen en laboratorio (*in vitro*), pero estos tejidos son capaces de diferenciarse hasta niveles similares a los del tejido control una vez implantados *in vivo*.

De hecho, nuestro grupo de investigación demostró que la mucosa oral artificial humana mantenida en cultivo hasta 3 semanas presenta bajo nivel de diferenciación y escasa diferenciación epitelial, lo que se demuestra en la ausencia de estrato córneo, crestas y papilas y otras estructuras de diferenciación terminal, las cuales se desarrollan una vez implantada *in vivo* en animales de laboratorio (Garzon *et al.*, 2009; Alfonso-Rodríguez *et al.*, 2015). En el caso de la mucosa palatina del conejo de laboratorio, trabajos previos constataron que la mucosa oral artificial es capaz de diferenciarse y expresar marcadores de maduración y diferenciación análogos a la mucosa oral nativa control una vez implantada *in vivo* ortotópicamente (Fernández-Valadés-Gámez *et al.*, 2016).

A este respecto, el estudio de marcadores epiteliales en la capa epitelial del sustituto palatino multicapa mantenido *in vitro* reveló la presencia de diversas citoqueratinas propias del epitelio estratificado de la mucosa oral (CK4, 13 y 19), aunque la expresión aparecía en la mayoría de los estratos epiteliales a diferencia de las muestras control. Además, los tejidos artificiales no expresaban la citoqueratina CK5 *in vitro*, la cual

era positiva en los controles. Estos resultados concuerdan con hallazgos previos del Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada y demuestran que la mucosa oral generada por ingeniería tisular y mantenida *in vitro* presenta cierto nivel de diferenciación y queratinización en este estadio, pero que no alcanza los niveles de diferenciación de la mucosa palatina nativa (Garzon *et al.*, 2009; Garzón *et al.*, 2009, 2013).

Al injertar *in vivo* el sustituto palatino multicapa, se encontraron ciertas diferencias respecto a los tejidos mantenidos *in vitro*. En concreto, el patrón de expresión de citoqueratinas tiende a asemejarse al del tejido control (expresión positiva suprabasal de CK4, 13, 5 y 19), aunque su expresión es menor que en las muestras control. Probablemente, este cambio de expresión de citoqueratinas una vez implantados los tejidos se deba a la recepción de señales locales y paracrinas aportados por los tejidos adyacentes y el torrente circulatorio, los cuales son capaces de inducir diferenciación y biointegración en el nuevo sustituto multicapa (Martín-Cano *et al.*, 2013). Posiblemente, tiempos de seguimiento más prolongados puedan asociarse a mayores niveles de diferenciación del sustituto multicapa.

Con respecto a la capa estromal de la mucosa oral del sustituto palatino multicapa, nuestros resultados sugieren que los tejidos artificiales mantenidos *in vitro* presentan escasos niveles de maduración y diferenciación tisular, al igual que ocurría con el epitelio. Por un lado, la estructura histológica del estroma artificial reveló la existencia de un sustituto tisular rico en fibras organizadas en todas las direcciones del

espacio, con algunas células en su interior, pero no existían vasos sanguíneos ni estructuras de diferenciación tipo crestas o papilas. Por otro lado, la composición de este estroma confirmó su escaso nivel de diferenciación por la significativamente menor presencia de fibras de colágeno y elásticas y de proteoglicanos en comparación con el paladar control. Estos resultados vuelven a coincidir con trabajos previos que demostraron que el estroma de la mucosa oral generada por ingeniería tisular presenta escasos niveles de diferenciación mientras se mantiene *in vitro* (Viñuela-Prieto *et al.*, 2015; Fernández-Valadés-Gámez *et al.*, 2016). Sin embargo, el uso de estos tejidos artificiales podría permitir la reparación de los tejidos dañados de forma eficiente al integrarse de forma satisfactoria en el lecho receptor.

Una vez implantado *in vivo* el sustituto palatino multicapa, encontramos un aumento de los niveles de diferenciación del estroma. En primer lugar, la estructura histológica del estroma fue muy similar a la del estroma control, encontrándose un gran número de vasos sanguíneos y células estromales de distinta naturaleza (fibroblastos, macrófagos, etc.), así como incipientes crestas y papilas. Todos estos hallazgos vuelven a confirmar la importancia del ambiente *in vivo* como medio inductor de la diferenciación tisular. En segundo lugar, encontramos diferencias significativas en la composición del estroma implantado *in vivo*. En concreto, el estroma mantenido *in vivo* presentó mayor cantidad de proteoglicanos, fibras de colágeno y fibras elásticas, aunque sus niveles no alcanzaron los niveles del tejido control.

Los proteoglicanos se encuentran entre los constituyentes tisulares más importantes tanto desde un punto de vista estructural como funcional. Los proteoglicanos están normalmente constituidos por una proteína central unida por enlaces covalentes a uno o más glucosaminoglicanos del mismo o de diferente tipo (Theocharis *et al.*, 2016). Los proteoglicanos interactúan con numerosos factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas, receptores celulares de superficie y moléculas de la matriz extracelular para posibilitar la correcta fisiología del tejido conectivo (Maquart, 2015; Heindryckx y Li, 2018). El aumento de la expresión de proteoglicanos en el estroma injertado *in vivo* podría explicarse por la inducción de tejidos adyacentes o aportados vía sanguínea y estaría relacionado con una mayor funcionalidad de este tejido en procesos como señalización, proliferación, migración, diferenciación, apoptosis y adhesión celular.

En lo que respecta a los componentes fibrilares del estroma, su aumento en las muestras *in vivo* podría estar en relación con mayor diferenciación tisular y con un incremento de sus propiedades biomecánicas (resistencia, elasticidad, adaptabilidad, etc.), así como una mayor capacidad de reacción a las fuerzas masticatorias, las cuales inducirían a su vez la síntesis de estos componentes fibrilares (Wagenseil y Mecham, 2007; Muiznieks, Weiss y Keeley, 2010). Por estas razones, es posible que el completo desarrollo de estas fibras requiera más estimulación funcional *in vivo* durante mayores tiempos de seguimiento. Curiosamente hemos encontrado una correlación entre las fibras elásticas y las fibras colágenas y entre la cantidad de estas fibras y la cantidad de proteoglicanos. Las fibras colágenas son las principales

responsables de la rigidez a la torsión y la resistencia mecánica, y de nuevo los resultados muestran que es necesaria una estimulación mecánica *in vivo* para conseguir una completa diferenciación e inducción de la fibrinogénesis y alineación de las fibras colágenas (Theocharis *et al.*, 2016). El hecho de que en nuestros tejidos injertados *in vivo* las fibras colágenas estén correctamente orientadas sugiere que éstas son funcionales rápidamente tras la implantación del sustituto palatino multicapa.

En el caso del hueso generado por ingeniería tisular, trabajos previos del grupo de investigación demostraron que los sustitutos óseos de fibrina-agarosa con células madre mesenquimales diferenciadas hacia la estirpe osteogénica presentan escasos niveles de diferenciación *in vitro* (Nieto-Aguilar *et al.*, 2011). Sin embargo, pudimos demostrar en trabajos previos que estos tejidos son capaces de diferenciarse una vez implantados *in vivo* a nivel del paladar duro, expresando marcadores óseos como osteocalcina (Liceras-Liceras *et al.*, 2017).

En primer lugar, el análisis del hueso en el sustituto palatino multicapa mantenido *in vitro* reveló menor cantidad de componentes fundamentales del hueso como son la osteocalcina, las fibras de colágeno y el componente mineralizado en comparación con los controles de hueso nativo, lo que sugiere, de nuevo, que estas estructuras presentan bajos niveles de maduración y diferenciación. Sin embargo, tras ser injertado, el tejido *in vivo* se asocia con un aumento de la mineralización y de la expresión de osteocalcina, aunque en menor nivel que el tejido control, lo que también hemos observado en el estroma y en el epitelio

del sustituto palatino multicapa. En cuanto al colágeno del hueso, nuestros resultados revelan que, una vez implantado, el hueso artificial sintetiza colágeno en cantidades similares a los del paladar control, lo cual sugiere que este importante componente de la matriz no mineralizada del hueso madura de forma rápida una vez injertado en el animal de laboratorio.

La mineralización es un paso fundamental en la diferenciación de los osteoblastos en osteocitos, y su presencia es un buen indicador de diferenciación ósea. La existencia de mineralización en el tejido artificial implantado *in vivo* muestra que el sustituto óseo es capaz de madurar cuando se implanta, aunque los niveles de mineralización sean menores que en el hueso control. La correlación entre la mineralización y el contenido de osteocalcina confirma que el tejido injertado está en proceso de maduración, ya que esta proteína es sintetizada de forma exclusiva por los osteoblastos (Zoch, Clemens y Riddle, 2016).

Tanto el defecto congénito como las lesiones palatinas inducidas durante la cirugía pueden asociarse a alteraciones en el crecimiento del maxilar (Shi y Losee, 2015; Xu *et al.*, 2015). A este respecto, uno de los hallazgos más relevantes de esta Tesis Doctoral es la capacidad del sustituto palatino multicapa para prevenir las alteraciones del crecimiento inducidas por un defecto osteo-mucoso. En concreto, encontramos que los controles negativos en los que a los animales se les creó un defecto no reparado a nivel del hemipaladar derecho presentaban un crecimiento palatino menor en el hemipaladar intervenido en comparación con el hemipaladar izquierdo, que se

mantuvo intacto. Estos resultados confirman trabajos previos que demostraron que las lesiones osteo-mucosas del paladar se acompañan de un menor crecimiento y, por tanto, conducen a una hipoplasia maxilar (Shi y Losee, 2015; Xu *et al.*, 2015). Por el contrario, los animales en los que se injertó el sustituto palatino multicapa presentaron un crecimiento similar en ambos hemipaladares, no mostrando diferencias con el animal control que no fue intervenido. Estos resultados permiten abrir la puerta al uso de este tipo de sustitutos palatinos para el tratamiento de pacientes a los que es preciso reparar defectos palatinos osteo-mucosos. Para ello, será necesario cumplir los requerimientos de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) referente a productos de terapias avanzadas, incluyendo la fabricación en salas GMP y la evaluación terapéutica en ensayos clínicos aleatorizados.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el sustituto palatino multicapa generado en esta Tesis Doctoral, es capaz de integrarse en el huésped y de contribuir a un desarrollo palatino normal. La maduración y la diferenciación del tejido implantado son adecuadas, aunque no se ha alcanzado una diferenciación completa. Esta podría ser la primera evidencia científica de que una estructura compleja conformada por diferentes capas de tejido (epitelio, estroma y hueso) puede ser diseñada y fabricada en laboratorio para uso clínico en paladar humano. El hecho de que el tejido artificial no haya alcanzado una maduración y diferenciación completa una vez implantado *in vivo* puede estar relacionado con la presencia de varias capas de tejido en una única estructura, lo que podría dificultar la distribución de señales inductoras de diferenciación procedentes de tejidos adyacentes hacia las capas más

internas del tejido artificial. Otra hipótesis podría ser que los tejidos requieran más tiempo tras el injerto para su maduración y diferenciación dependientes de los nuevos estímulos *in vivo*, incluyendo una adecuada estimulación biomecánica. Para comprobar estas hipótesis, serán necesarios futuros estudios en los que los tejidos injertados sean analizados tras un seguimiento más largo.

CONCLUSIONES

De los resultados de la presente Tesis Doctoral podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. La utilización de métodos de ingeniería tisular basados en biomateriales de fibrina-agarosa y cultivos celulares primarios de células estromales y epiteliales de la mucosa palatina permitió generar un modelo de mucosa palatina artificial análogo a la mucosa nativa.

2. La aplicación de técnicas de transdiferenciación de células madre mesenquimales del tejido adiposo inmersas en biomateriales de fibrina-agarosa posibilitó la creación de un tejido artificial análogo al hueso con características similares a las del hueso nativo, aunque con menor nivel de mineralización y maduración, que podría tener utilidad clínica en el futuro.

3. Las técnicas de nanoestructuración basadas en compresión plástica permitieron fusionar eficientemente distintas estructuras generadas mediante ingeniería tisular (una mucosa oral con epitelio y estroma y un sustituto óseo) para obtener un sustituto multicapa del paladar duro. Al integrar la mayor parte de los componentes del paladar duro, este modelo aporta una estructura más anatómica y funcional y ofrece una nueva herramienta terapéutica para la reparación del paladar.

4. El análisis *in vivo* del sustituto completo del paladar duro en animales de experimentación permitió comprobar la posible clínica de esta estructura para la reparación de defectos palatinos ya que ésta se integra correctamente en el animal receptor y no se observaron signos de rechazo, malignización, infección u otras patologías relevantes. Además, desde un punto de vista morfo-funcional, el uso de los sustitutos palatinos multicapa favorece el desarrollo y crecimiento normales del paladar de los animales de experimentación previniendo las alteraciones encontradas en animales en los que no se utilizó este sustituto.

5. El análisis histológico, histoquímico e inmunohistoquímico de los sustitutos palatinos multicapa elaborados en esta Tesis Doctoral reveló la existencia de un tejido artificial escasamente diferenciado mientras éste se mantuvo *in vitro*. Una vez implantado *in vivo* en animales de experimentación, el tejido artificial alcanzó niveles de maduración y diferenciación significativamente superiores a los del tejido mantenido *in vitro* y a los de los animales control negativo, aunque no se alcanzaron los niveles del paladar nativo no intervenido.

6. En conjunto, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral sugieren que los sustitutos palatinos multicapa podrían ser útiles para el tratamiento de pacientes a los que es preciso reparar defectos palatinos osteo-mucosos, contribuyendo a un mejor desarrollo morfo-funcional e histológico de los tejidos a reparar.

BIBLIOGRAFÍA

Alfonso-Rodríguez, C. A., González-Andrades, E., Jaimes-Parra, B. D., Fernández-Valadés, R., Campos, A., Sánchez-Quevedo, M. C., Alaminos, M., Garzón, I. (2015) 'Ex vivo and in vivo modulatory effects of umbilical cord Wharton's jelly stem cells on human oral mucosa stroma substitutes'. *Histology and Histopathology* 30(11): 1321-1332. doi: 10.14670/HH-11-628.

Amin, K., Khor, W. S., Rosich-Medina, A., Beale, V. (2015) 'Alveolar Bone Grafting: Donor Site Review of 100 Consecutive Cases in Cleft Lip and Palate'. *The Cleft palate-craniofacial journal* 54(2): 137-141. doi: 10.1597/15-180 [doi].

Arangio, P., Marianetti, T. M., Tedaldi, M., Ramieri, V., Cascone, P. (2008) 'Early secondary alveoloplasty in cleft lip and palate'. *Journal of Craniofacial Surgery* 19(5): 1364-1369. doi: 10.1097/SCS.0b013e31818434c3.

Arosarena, O. A. (2007) 'Cleft Lip and Palate'. *Otolaryngologic Clinics of North America* 40(1): 27-60. doi: 10.1016/j.otc.2006.10.011.

Azi, M. L., Aprato, A., Santi, I., Junior, M. K., Masse, A., Joeris, A. (2016) 'Autologous bone graft in the treatment of post-traumatic bone defects: a systematic review and meta-analysis'. *BMC Musculoskeletal*

Disorders 17(1): 1–10. doi: 10.1186/s12891-016-1312-4.

Bajestan, M. N., Rajan, A., Edwards, S. P., Aronovich, S., Cevidanes, L. H. S., Polymeri, A., Travan, S., Kaigler, D. (2017) 'Stem cell therapy for reconstruction of alveolar cleft and trauma defects in adults: A randomized controlled, clinical trial'. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 19(5): 793–801. doi: 10.1111/cid.12506.

Bousdras, V., Ayliffe, P., Barrett, M., Hopper, C. (2015) 'Esthetic and functional rehabilitation in patients with cleft lip and palate'. *Annals of Maxillofacial Surgery* 5(1): 108–11. doi: 10.4103/2231-0746.161109.

Brown, J. S., Shaw, R. J. (2010) 'Reconstruction of the maxilla and midface: Introducing a new classification'. *The Lancet Oncology* 11(10): 1001–1008. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70113-3.

Campos Muñoz, A. (2004) 'Cuerpo, histología y medicina. De la descripción microscópica a la ingeniería tisular.', en *Discurso de ingreso a la Real Academia Nacional de Medicina*.

Cheema, U., Brown, R. A. (2013) 'Rapid Fabrication of Living Tissue Models by Collagen Plastic Compression: Understanding Three-Dimensional Cell Matrix Repair In Vitro'. *Advances in Wound Care* 2(4): 176-184. doi: 10.1089/wound.2012.0392.

Cho-Lee, G.-Y., García-Díez, E.-M., Nunes, R.-A., Martí-Pagès, C., Sieira-Gil, R., Rivera-Baró, A. (2013) 'Review of secondary alveolar cleft repair'. *Annals of Maxillofacial Surgery* 3(1): 46. doi: 10.4103/2231-0746.110083.

Colbert, S. D., Green, B., Brennan, P. A., Mercer, N. (2015) 'Contemporary management of cleft lip and palate in the United Kingdom. Have we reached the turning point?'. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 53(7): 594–598. doi: 10.1016/j.bjoms.2015.06.010.

Fernández-Valadés-Gámez, R., Garzón, I., Liceras-Liceras, E., España-López, A., Carriel, V., Martín-Piedra, M. Á., Muñoz-Miguelsanz, M. Á., Sánchez-Quevedo, M. C., Alaminos, M., Fernández-Valadés, R. (2016) 'Usefulness of a bioengineered oral mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiosteal defect'. *Biomedical Materials (Bristol)* 11(1): 15015. doi: 10.1088/1748-6041/11/1/015015.

Franke, W. W., Schiller, D. L., 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'. *Journal of Molecular Biology* 153(4): 933–959. doi: 10.1016/0022-2836(81)90460-5.

Garzon, I., Serrato, D., Roda, O., Del Carmen Sánchez-Quevedo, M., González-Jaranay, M., Moreu, G., Nieto-Aguilar, R., Alaminos, M., Campos, A. (2009) 'In vitro cytokeratin expression profiling of human oral mucosa substitutes developed by tissue engineering'. *International Journal of Artificial Organs* 32(10): 711–719. doi: 10.1177/039139880903201002.

Garzón, I., Sánchez-Quevedo, M. C., Moreu, G., González-Jaranay, M., González-Andrades, M., Montalvo, A., Campos, A., Alaminos, M. (2009)

'In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa'. *Journal of Periodontal Research* 44(5): 588–597. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01159.x.

Garzón, I., Miyake, J., González-Andrades, M., Carmona, R., Carda, C., Sánchez-Quevedo, M. del C., Campos, A., Alaminos, M. (2013) 'Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration.' *Stem cells translational medicine* 2(8): 625–32. doi: 10.5966/sctm.2012-0157.

Gavin Clavero, M. A., Simón Sanz, M. V., Jariod Ferrer, M., Mur Til, A. (2017) 'Versatility of buccinator flaps for the treatment of palatal defects: a series of cases'. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 55(4):357–362. doi: 10.1016/j.bjoms.2016.12.008.

Ge, J., Yang, C., Zheng, J., Hu, Y. (2017) 'Autogenous bone grafting for treatment of osseous defect after impacted mandibular third molar extraction: A randomized controlled trial', *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 19(3), pp. 572–580. doi: 10.1111/cid.12466.

Geneser, F. (2003) *Histología*. 3ª. Ed. Med. Panamericana. ISBN: 950-06-0883-0.

Gómez de Ferraris, María; Campos, A. (2009) *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular y Bucodental*. 3º. Ed. Med. Panamericana. ISBN: 9786077743019.

Hanny, K. H., de Vries, I. A. C., Haverkamp, S. J., Oomen, K. P. Q., Penris, W. M., Eijkemans, M. J. C., Kon, M., Mink van der Molen, A. B.,

Breugem, C. C. (2016) 'Late detection of cleft palate'. *European Journal of Pediatrics* 175(1): 71–80. doi: 10.1007/s00431-015-2590-9.

Heindryckx, F., Li, J. P. (2018) 'Role of proteoglycans in neuro-inflammation and central nervous system fibrosis'. *Matrix Biology* 68-69: 589–601. doi: 10.1016/j.matbio.2018.01.015.

Hendriks, J., Riesle, J. y Blitterswijk, C. A. van (2010) 'Co-culture in cartilage tissue engineering'. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 4(7): 524–531. doi: 10.1002/term.

Hicok, K. C. y Hedrick, M. H. (2007) 'Stem cells and the art of mesenchymal maintenance', in Bronner, F., Farach-Carson, M., Mikos, A. (eds) *Engineering of Functional Skeletal Tissues*. Springer-Verlag. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-84628-366-6_1 http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-84628-366-6_7B_7D1.

Huang, J., Tian, B., Chu, F., Yang, C., Zhao, J., Jiang, X., Qian, Y. (2015) 'Rapid maxillary expansion in alveolar cleft repaired with a tissue-engineered bone in a canine model'. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 48: 86–99. doi: 10.1016/j.jmbbm.2015.03.029.

Isik, D., Atik, B., Tan, O., Aktar, S., Dogan, M. y Goktas, U. (2011) 'Primary repair of the alveolar cleft'. *Journal of Craniofacial Surgery* 22(6): 2224–2226. doi: 10.1097/SCS.0b013e31823200c3.

Ito, S., Noguchi, M., Suda, Y., Yamaguchi, A., Kohama, G., Yamamoto, E. (2006) 'Speech evaluation and dental arch shape following pushback

palatoplasty in cleft palate patients: Supraperiosteal flap technique versus mucoperiosteal flap technique'. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 34(3): 135–143. doi: 10.1016/j.jcms.2005.11.006.

Janssen, N. G., Weijs, W. L. J., Koole, R., Rosenberg, A. J. W. P., Meijer, G. J. (2014) 'Tissue engineering strategies for alveolar cleft reconstruction: a systematic review of the literature'. *Clinical Oral Investigations* 18(1): 219–226. doi: 10.1007/s00784-013-0947-x.

Kačarević, Ž. P. (2018) 'Bioprinting of tissue engineering scaffolds'. *Article in Journal of Tissue Engineering* 9: 1-16. doi: 10.1177/2041731418802090.

Kamal, M., Andersson, L., Tolba, R., Bartella, A., Gremse, F., Hölzle, F., Kessler, P., Lethaus, B. (2017) 'A rabbit model for experimental alveolar cleft grafting'. *Journal of Translational Medicine* 15(1): 1–11. doi: 10.1186/s12967-017-1155-2.

Khojasteh, A., Kheiri, L., Motamedian, S. R., Nadjmi, N. (2015) 'Regenerative medicine in the treatment of alveolar cleft defect: A systematic review of the literature'. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 43(8): 1608–1613. doi: 10.1016/j.jcms.2015.06.041.

Khojasteh, A., Sadeghi, N. (2016) 'Application of buccal fat pad-derived stem cells in combination with autogenous iliac bone graft in the treatment of maxillomandibular atrophy: A preliminary human study'. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 45(7):864-871. doi: 10.1016/j.ijom.2016.01.003.

Kim, R.-W., Kim, J.-H., Moon, S.-Y. (2016) 'Effect of hydroxyapatite on critical-sized defect'. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery* 38(1): 26. doi: 10.1186/s40902-016-0072-2.

Langer, R., Vacanti, J. (2016) 'Advances in tissue engineering'. *Journal of Pediatric Surgery* 51(1): 8-12. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022.

Levi, B., James, A. W., Nelson, E. R., Vistnes, D., Wu, B., Lee, M., Gupta, A., Longaker, M. T. (2010) 'Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects'. *PLoS ONE*, 5(6): e11177. doi: 10.1371/journal.pone.0011177.

Liceras-Liceras, E., Garzón, I., España-López, A., Oliveira, A.-C.-X., García-Gómez, M., Martín-Piedra, M.-Á., Roda, O., Alba-Tercedor, J., Alaminos, M., Fernández-Valadés, R. (2017) 'Generation of a bioengineered autologous bone substitute for palate repair: an *in vivo* study in laboratory animals'. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11(6): 1907–1914. doi: 10.1002/term.2088.

Liliana, M. R., Daniela, E. D., Eleonora, A. D. (2015) 'Bioethical dilemmas in using animal in medical research. Challenges and opportunities'. *Rom J Morphol Embryol* 56(3): 1227–1231.

Maquart, F.-X. (2015) 'Extracellular matrix: a major partner of wound healing.'. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 199(7): 1199–1209.

Martín-Cano, F., Garzón, I., Marañés, C., Liceras, E., Martín-Piedra,

M. A., Ruiz-Montes, A. M., Alaminos, M., Fernández-Valadés, R. (2013) 'Histological and immunohistochemical changes in the rat oral mucosa used as an autologous urethral graft'. *Journal of Pediatric Surgery* 48(7): 1557–1564. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2013.01.056.

Martins, N. I., Sousa, M. P., Custódio, C. A., Pinto, V. C., Sousa, P. J., Minas, G., Cleymand, F., Mano, J. F. (2017) 'Multilayered membranes with tuned well arrays to be used as regenerative patches'. *Acta Biomaterialia* 57: 313–323. doi: 10.1016/j.actbio.2017.04.021.

Matsui, Y., Ohno, K., Nishimura, A., Shirota, T., Kim, S., Miyashita, H. (2007) 'Long-term study of dental implants placed into alveolar cleft sites'. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 44(4): 444–447. doi: 10.1597/06-095.1.

Meyer, U., Wiesmann, H. P. (2006) 'Scaffold Structure and Fabrication', in Gabriele Schröder, H. (ed.) *Bone and Cartilage Engineering*. Berlin: Springer-Verlag, pp 163–177. ISBN-13: 978-3540253471.

Moll, R., Franke, W. W., Volc-Platzer, B., Krepler, R. (1982) 'Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: A specific cytokeratin of molecular weight 46,000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas'. *Journal of Cell Biology* 95(1): 285–295. doi: 10.1083/jcb.95.1.285.

Moreau, J. L., Caccamese, J. F., Coletti, D. P., Sauk, J. J., Fisher, J. P. (2007) 'Tissue Engineering Solutions for Cleft Palates'. *Journal of Oral*

and *Maxillofacial Surgery* 65(12): 2503–2511. doi:
10.1016/j.joms.2007.06.648.

Muiznieks, LD. Weiss, AS., Keeley, FW. (2010) 'Structural disorder and dynamics of elastin'. *Biochemistry and Cell Biology* 88(2): 239-50. doi: 10.1139/O09-124.

Murphy, S. V., Atala, A. (2014) '3D bioprinting of tissues and organs', *Nature Biotechnology* 32(8): 773–785. doi: 10.1038/nbt.2958.

Muzaffar, A. R., Warren, A., Baker, C. L. (2016) 'Use of the On-Q pain pump in Alveolar bone grafting: Effect on hospital length of stay'. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 53(2): e23–e27. doi: 10.1597/14-174.

Nieto-Aguilar, R., Serrato, D., Garzón, I., Campos, A., Alaminos, M. (2011) 'Pluripotential differentiation capability of human adipose-derived stem cells in a novel fibrin-agarose scaffold'. *Journal of Biomaterials Applications* 25(7): 743–768. doi: 10.1177/0885328209360425.

Oliveira, A. C., Garzón, I., Ionescu, A. M., Carriel, V., Cardona, J. de la C., González-Andrades, M., Pérez, M. del M., Alaminos, M., Campos, A. (2013) 'Evaluation of Small Intestine Grafts Decellularization Methods for Corneal Tissue Engineering'. *PLoS ONE*, 8(6): e66538. doi: 10.1371/journal.pone.0066538.

Ophof, R., Maltha, J. C., Kuijpers-Jagtman, A. M., Von Den Hoff, J. W. (2008) 'Implantation of tissue-engineered mucosal substitutes in the dog palate'. *European Journal of Orthodontics* 30(1): 1–9. doi:

10.1093/ejo/cjm082.

Palmen, C., Gullane, P. (2006) 'Principles and History of Oral Cavity Reconstruction', in Day, T. y Girod, D. (eds) *Oral Cavity Reconstruction*. DOI: 10.1201/b14273-3.

Panetta, N. J., Gupta, D. M., Longaker, M. T. (2009) 'Bone Tissue Engineering Scaffolds of today and tomorrow'. *The Journal of Craniofacial Surgery* 20(5): 1531–1532. doi: 10.1097/SCS.0b013e3181b09c02.

Pearson, G., Kirrrschner, R. (2014) 'Cleft Lip and Palate Malformations', in Elden, L. y Zur, K. (eds) *Congenital Malformations of Head and Neck*. Springer. doi: 10-1007/978-1-4419-1714-0_5.

Pessoa, E. A. M. E., Braune, A., Casado, P. L., Tannure, P. N. (2017) 'Alveolar bone raft: Clinical profile and risk factors for complications in oral cleft patients'. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 54(5): 530–534. doi: 10.1597/16-028.

De Ponte, F. S., Falzea, R., Runci, M., Siniscalchi, E. N., Lauritano, F., Bramanti, E., Cervino, G., Cicciu, M. (2017) 'Histomorphological and clinical evaluation of maxillary alveolar ridge reconstruction after craniofacial trauma by applying combination of allogeneic and autogenous bone graft'. *Chinese Journal of Traumatology - English Edition* 20(1): 14–17. doi: 10.1016/j.cjtee.2016.10.005.

Pourebrahim, N., Hashemibeni, B., Shahnasari, S., Torabinia, N., Mousavi, B., Adibi, S., Heidari, F., Alavi, M. J. (2013) 'A comparison of tissue-engineered bone from adipose-derived stem cell with autogenous

bone repair in maxillary alveolar cleft model in dogs'. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 42(5): 562–568. doi: 10.1016/j.ijom.2012.10.012.

Pradel, W., Mai, R., Manolo Hagedorn, G., Lauer, G., Allegrini, S. (2008) 'The biomaterial influences the ossification after sinus floor elevation using tissue-engineered bone grafts'. *Biomedizinische Technik*, 53(5): 224–228. doi: 10.1515/BMT.2008.034.

Pradel, W., Lauer, G. (2012) 'Tissue-engineered bone grafts for osteoplasty in patients with cleft alveolus'. *Annals of Anatomy*. Elsevier GmbH, 194(6): 545–548. doi: 10.1016/j.aanat.2012.06.002.

Rahpeyma, A., Khajehahmadi, S. (2015) 'Reconstruction of the maxilla by submental flap'. *ANZ Journal of Surgery* 85(11): 873-877. doi: 10.1111/ans.12638.

Raposo-Amaral, C. A., Denadai, R., Chammas, D. Z., Marques, F. F., Pinho, A. S., Roberto, W. M., Buzzo, C. L., Raposo-Amaral, C. E. (2015) 'Cleft patient-reported postoperative donor site pain following alveolar autologous iliac crest bone grafting: Comparing two minimally invasive harvesting techniques'. *Journal of Craniofacial Surgery* 26(7): 2099–2103. doi: 10.1097/SCS.0000000000002077.

Raul, U., Sawant, S., Dange, P., Kalraiya, R., Ingle, A., Vaidya, M. (2004) 'Implications of cytokeratin 8/18 filament formation in stratified epithelial cells: Induction of transformed phenotype'. *International Journal of Cancer* 111(5): 662–668. doi: 10.1002/ijc.20349.

Scionti, G., Moral, M., Toledano, M., Osorio, R., Durán, J. D. G., Alaminos, M., Campos, A., Lopez-Lopez, M. T. (2014) 'Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model'. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 102(8): 2573-2582 doi: 10.1002/jbm.a.34929.

Semb, G. (2012) 'Alveolar bone grafting'. *Frontiers of Oral Biology* 16: 124–136. doi: 10.1159/000337666.

Seok, H., Kim, M.-K., Kim, S.-G. (2016) 'Reconstruction of partial maxillectomy defect with a buccal fat pad flap and application of 4-hexylresorcinol: a case report'. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 42(6): 370–374. doi: 10.5125/jkaoms.2016.42.6.370.

Shi, B., Losee, J. E. (2015) 'The impact of cleft lip and palate repair on maxillofacial growth'. *International Journal of Oral Science* 7(1): 14–17. doi: 10.1038/ijos.2014.59.

Silva, J. M., Caridade, S. G., Reis, R. L., Mano, J. F. (2016) 'Polysaccharide-based freestanding multilayered membranes exhibiting reversible switchable properties'. *Soft matter* 12(4): 1200–9. doi: 10.1039/c5sm02458g.

Spiegel, J., Dexheler, D. (2006) 'Anatomy of the Oral Cavity and Related Structures.', in Day, T. y Girod, D. (eds) *Oral Cavity Reconstruction*. DOI: 10.1201/b14273-3.

Stanko, P., Mracna, J., Stebel, A., Usakova, V., Smrekova, M.,

Vojtassak, J. (2013) 'Mesenchymal stem cells - A promising perspective in the orofacial cleft surgery'. *Bratislava Medical Journal* 114(2): 50-52. doi: 10.4149/BLL-2013-012.

Strietzel, F. P. (2006) 'Tissue-engineered bone for lateral alveolar ridge augmentation: A case report'. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 21(1): 131-135.

Tavakolinejad, S., Ebrahimzadeh Bidskan, A., Ashraf, H., Hamidi Alamdari, D. (2014) 'A Glance at Methods for Cleft Palate Repair'. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 16(9): 1-8. doi: 10.5812/ircmj.15393.

Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., Karamanos, N. K. (2016) 'Extracellular matrix structure'. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97: 4-27. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001.

Tong, S., Xu, D. P., Liu, Z. M., Du, Y., Wang, X. K. (2016) 'Synthesis of and in vitro and in vivo evaluation of a novel TGF-1-SF-CS three-dimensional scaffold for bone tissue engineering'. *International Journal of Molecular Medicine* 38(2): 367-380. doi: 10.3892/ijmm.2016.2651.

Ueda, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Okazaki, Y. (2005) 'Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement.' *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 25(2): 129-37. doi: 10.1016/j.prosdent.2005.05.019.

Viñuela-Prieto, J. M., Sánchez-Quevedo, M. C., Alfonso-Rodríguez, C. A., Oliveira, A. C., Scionti, G., Martín-Piedra, M. A., Moreu, G., Campos, A.,

Alaminos, M., Garzón, I. (2015) 'Sequential keratinocytic differentiation and maturation in a three-dimensional model of human artificial oral mucosa'. *Journal of Periodontal Research* 50(5): 658–665. doi: 10.1111/jre.12247.

Wadsworth, J. T., Futran, N. (2006) 'Hard Palate Reconstruction', in Terry, A. D. y Douglas, A. G. (eds) *Oral Cavity Reconstruction*. New York: Taylor & Francis Group, pp. 253–273. ISBN: 10-1-57444-892-7.

Wagenseil, J. E., Mecham, R. P. (2007) 'New insights into elastic fiber assembly'. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* 81(4): 229–240. doi: 10.1002/bdrc.20111.

Weinzierl, K., Hemprich, A., Frerich, B. (2006) 'Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells'. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 34(8): 466–471. doi: 10.1016/j.jcms.2006.07.860.

De Witte, T.-M., Fratila-Apachitei, L. E., Zadpoor, A. A., Peppas, N. A. (2018) 'Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices'. *Regenerative Biomaterials* 5(1): 197-211. doi: 10.1093/rb/rby013.

Wu, J., Wang, G. (2012) '[Evaluation of orthodontic teeth moving in bone graft area by dental CT].', *Hua xi kou qiang yi xue za zhi = Huaxi kouqiang yixue zazhi = West China journal of stomatology*, 30(4): 383–387. doi: <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1000-1182.2012.04.013>.

Xu, X., Kwon, H. J., Shi, B., Zheng, Q., Yin, H., Li, C. (2015) 'Influence of different palate repair protocols on facial growth in unilateral

complete cleft lip and palate'. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 43(1): 43–47. doi: 10.1016/j.jcms.2014.10.007.

Xu, Y., Malladi, P., Wagner, D. R., Longaker, M. T. (2005) 'Adipose-derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal regeneration.'. *Current opinion in molecular therapeutics*, 7(4). 300–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16121695>.

Yoshida, Y., Yamanaka, S. (2017) 'Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later'. *Circulation Research* 120(12): 1958–1968. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311080.

You, S., Li, J., Zhu, W., Yu, C., Mei, D., Chen, S. (2018) 'Nanoscale 3D printing of hydrogels for cellular tissue engineering'. *Journal of Materials Chemistry B* 6(15): 2187–2197. doi: 10.1039/c8tb00301g.

Zoch, M. L., Clemens, T. L., Riddle, R. C. (2016) 'New insights into the biology of osteocalcin'. *Bone* 82: 42–49. doi: 10.1016/j.bone.2015.05.046.