

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**GENERACIÓN DE UN SUSTITUTO ÓSEO HUMANO MEDIANTE  
INGENIERÍA TISULAR PARA EL TRATAMIENTO DE DEFECTOS  
MANDIBULARES**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

Belén Gironés Camarasa

Universidad de Granada

Facultad de medicina

2024

# **GENERACIÓN DE UN SUSTITUTO ÓSEO HUMANO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR PARA EL TRATAMIENTO DE DEFECTOS MANDIBULARES**

Memoria que presenta la licenciada en Medicina Belén Gironés Camarasa para aspirar  
al título de Doctora

Fdo.: Belén Gironés Camarasa

V.ºB.º El Director de Tesis  
Fdo.: Dr. Ricardo Fernández Valadés  
Doctor en Medicina y Cirugía  
Hospital Universitario  
Virgen de las Nieves de Granada

V.ºB.º El Director de Tesis  
Fdo.: Dr. Miguel Alaminos Mingorance  
Doctor en Medicina y Cirugía  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Universidad de Granada

Departamento de Histología  
Universidad de Granada

2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Belén Gironés Camarasa  
ISBN: 978-84-1195-373-3  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92931>

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular CTS-115 del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y en la Unidad Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves e IBS GRANADA y financiada por los siguientes proyectos de investigación:

1. Generación de nuevos modelos de piel medicalizada a partir de la piel artificial de fibrina-agarosa ensayada clínicamente en grandes quemados. Funcionalización con fármacos y nuevos procesos de biofabricación (PE-0395-2019). Consejería de Salud y Familias. Junta de Andalucía. Proyectos de Investigación, Desarrollo e Innovación Biomédica y en Ciencias de la Salud 2019. Proyectos Estratégicos I+D+i con Incorporación de Capital Humano.
2. Elaboración de un sustituto osteo-mucoso biomimético 3D para el tratamiento de defectos graves de la cavidad oral (PI-0442-2019). Consejería de Salud y Familias. Junta de Andalucía. Proyectos de Investigación, Desarrollo e Innovación Biomédica y en Ciencias de la Salud 2019.
3. Mucosa palatina humana generada mediante ingeniería tisular para el tratamiento de la fisura palatina (BIOCLEFT ICI19/00024). Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Proyectos de Investigación Clínica Independiente de la Acción Estratégica en Salud 2019, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2017-2020.
4. Elaboración de paladar artificial nanoestructurado para su utilización en medicina regenerativa de la fisura palatina (FIS PI18/00332). Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad). Acción Estratégica en Salud 2018, del Programa Estatal de Investigación Orientada a los Retos de la Sociedad, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2013-2016.
5. Generación de nuevos modelos de mucosa oral humana masticatoria y de revestimiento con biomateriales funcionalizados y fuentes celulares alternativas para su uso en terapias avanzadas (FIS PI18/00331). Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad). Acción Estratégica en Salud 2018, del Programa Estatal de Investigación Orientada a los Retos de la Sociedad, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2013-2016.

Generación de un sustituto óseo humano mediante ingeniería tisular para el tratamiento de defectos mandibulares.

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

***Martin-Piedra MA, Gironés-Camarasa B, España-López A, Fernández-Valadés Gámez R, Blanco-Elices C, Garzón I, Alaminos M, Fernández-Valadés R. Usefulness of a Nanostructured Fibrin-Agarose Bone Substitute in a Model of Severely Critical Mandible Bone Defect. Polymers (Basel). 2021 Nov 15;13(22):3939. doi: 10.3390/polym13223939. Factor de Impacto: 4.967; Área: Polymer Science; Percentil: 17 (Q1)***

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar; gracias a Granada, una ciudad que me acogió cinco años muy especiales de mi vida, donde disfruté, aprendí e hice amigos para toda la vida.

No puedo presentar este trabajo sin mencionarlos a ellos, el equipo de Cirugía Pediátrica de Granada, el sitio que fue mi casa durante ese tiempo. Agradezco de todo corazón al Dr Ricardo Fernández Valadés, jefe y “Padre” de aquel equipo tan bonito; por su inmejorable enseñanza y guía en el campo de la cirugía, cuya sabiduría y experiencia han sido fundamentales en mi desarrollo académico y profesional, pero con quien además estuve muy a gusto y muy protegida cuando tuve momentos menos buenos.

Al Dr. Miguel Alaminos le debo un especial reconocimiento por su inmensa paciencia y eficacia en brindarme orientación y asesoramiento. Su dedicación y compromiso han sido inspiradores y han contribuido enormemente a mi progreso.

Al departamento de Histología por su colaboración desinteresada en los análisis histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos, soporte de esta tesis doctoral.

Al Dr. Antonio España por su colaboración en la realización de las intervenciones y los análisis radiológicos de los animales.

No puedo pasar por alto el apoyo incondicional de mi familia y amigos, quienes han sido mi roca y mi motivación constante.

Pero en especial, quiero dedicar mi más profundo agradecimiento al Dr Kamel Matar, quien no solo fué sido un excelente amigo, sino también un apoyo constante. Ese “Cirujano de guerra” del que tanto aprendí en el quirófano y fuera de él. Su amistad y aliento fueron un faro en momentos de incertidumbre, y su recuerdo lo seguirá siendo siempre que necesite un poco de luz.

Gracias.

## RESUMEN

Varias condiciones y enfermedades pueden afectar significativamente la región oral y maxilofacial, incluidas malformaciones congénitas, traumatismos, infecciones, tumores, osteonecrosis y otras patologías relevantes que pueden conducir a una pérdida significativa de tejido óseo. Los defectos graves del hueso mandibular son muy difíciles de tratar con los materiales y la tecnología disponibles en la actualidad. En la presente Tesis Doctoral, generamos sustitutos acelulares y celulares del hueso humano mediante ingeniería tisular, utilizando biomateriales nanoestructurados de fibrina-agarosa con y sin células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo diferenciadas del linaje osteogénico utilizando medios inductivos.

Una vez generado en el laboratorio el sustituto óseo, se realizaron controles de calidad a nivel biomecánico, citológico e histológico, para determinar parámetros de calidad para su futuro uso clínico tal y como establece la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Luego, estos sustitutos se evaluaron en un modelo animal inmunodeficiente generándoles un defecto óseo mandibular crítico, para evaluar el potencial de los tejidos bioartificiales para favorecer la regeneración ósea, siendo el tamaño de este defecto mayor que el habitualmente descrito en literatura previa, algo que nos permite acercarnos más a las situaciones clínicas reales.

Se realizó un análisis de la biocompatibilidad del modelo de hueso artificial, mostrando a nivel tanto macroscópico, como microscópico una buena integración del tejido artificial en la mandíbula con ausencia de complicaciones.

Los resultados mostraron que el uso de un sustituto óseo celular se asoció con una mejora morfofuncional de las estructuras maxilofaciales en comparación con los controles negativos. En cuanto al análisis del lugar del defecto, pudimos demostrar que ninguno de los grupos de estudio logró generar por completo el defecto mandibular. Sin embargo, el análisis de radiodensidad mediante tomografía CT demostró que el uso de un sustituto óseo celular pudo mejorar la densidad del tejido regenerado, con diferencias significativas respecto al control y al sustituto acelular.

Finalmente se realizó un estudio histoquímico e inmunohistoquímico de la zona del defecto en los distintos grupos de estudio. Estos resultados mostraron que el uso del sustituto óseo celular se asoció a la presencia de algunas islas de regeneración ósea en la zona del defecto. Cuando se analizó la estructura histológica y el comportamiento histoquímico e inmunohistoquímico de estas islas de regeneración, se encontró que éstas mostraron un perfil comparable al hueso control para rojo alizarina y versicán, y superior al hueso de control para azul de toluidina y osteocalcina.

Aunque estos resultados son preliminares, la presente Tesis Doctoral sugiere que los sustitutos óseos nanoestructurados generados por ingeniería tisular, especialmente en el caso de los sustitutos celulares, podrían ser útiles para el tratamiento de defectos críticos del hueso mandibular en un modelo animal de defecto óseo crítico de gran tamaño. Estos resultados abren la puerta al futuro uso de estos sustitutos para el tratamiento de pacientes con grandes defectos del hueso mandibular.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	8
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 ANATOMÍA DE LA MANDÍBULA. ....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 EMBRIOLOGÍA DE LA MANDIBULA. ....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 OSIFICACIÓN DE LA MANDIBULA. ....</b>	<b>21</b>
<b>1.4 HISTOLOGÍA DEL PERIODO DE OSIFICACIÓN MANDIBULAR.....</b>	<b>24</b>
<b>1.5 PATOLOGÍA DE LA REGIÓN MAXILOFACIAL. ....</b>	<b>25</b>
<b>1.6 TRATAMIENTOS ACTUALES DE LOS DEFECTOS MANDIBULARES. ....</b>	<b>29</b>
<b>1.7 CONCEPTOS FUNDAMENTALES EN REGENERACIÓN ÓSEA.....</b>	<b>38</b>
<b>1.8 DEFECTO ÓSEO CRÍTICO .....</b>	<b>40</b>
<b>1.9 TERAPIAS AVANZADAS E INGENIERÍA TISULAR. ....</b>	<b>43</b>
1.9.1 CONTEXTO ACTUAL DE LA INGENIERÍA TISULAR	43
1.9.2 MATRICES EXTRACELULARES O SCAFFOLDS.	47
1.9.3 TIPOS DE BIOMATERIALES.	49
1.9.4 TÉCNICAS DE PROCESADO	50
1.9.5 CELULAS OSTEOFORMADORAS. OSTEOBLASTOS. CELULAS MADRE. CELULAS MADRE EMBRIONARIAS.CELULAS MADRE ADULTAS. CELULAS MADRE PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS.	52
1.9.6 FACTORES DE CRECIMIENTO	56
1.9.7 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO(ADSCs)	57

<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>62</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>64</b>
<b>3.1</b>	<b>GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL TEJIDO ADIPOSO HUMANO.....</b>	<b>64</b>
<b>3.2</b>	<b>GENERACIÓN DE UN MODELO DE HUESO HUMANO ARTIFICIAL NANOESTRUCTURADO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR. ....</b>	<b>66</b>
<b>3.3</b>	<b>ANÁLISIS BIOMECÁNICO DEL HUESO HUMANO ARTIFICIAL NANOESTRUCTURADO GENERADO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.....</b>	<b>69</b>
<b>3.4</b>	<b>ANÁLISIS <i>IN VIVO</i> EN UN MODELO DE DEFECTO CRÍTICO MANDIBULAR.....</b>	<b>69</b>
<b>3.5</b>	<b>ANÁLISIS RADIOLÓGICOS.....</b>	<b>72</b>
<b>3.6</b>	<b>ANÁLISIS HISTOLÓGICOS. ....</b>	<b>74</b>
<b>3.7</b>	<b>ANÁLISIS HISTOQUÍMICOS.....</b>	<b>75</b>
<b>3.8</b>	<b>ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS.....</b>	<b>76</b>
<b>3.9</b>	<b>CUANTIFICACIÓN DE LA SEÑAL HISTOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO. 77</b>	
<b>3.10</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>77</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>GENERACIÓN DE UN MODELO DE HUESO HUMANO ARTIFICIAL NANOESTRUCTURADO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR. ....</b>	<b>80</b>
<b>4.2</b>	<b>ANÁLISIS DEL MODELO DE HUESO HUMANO ARTIFICIAL NANOESTRUCTURADO OBTENIDO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.....</b>	<b>81</b>

<b>4.3 ANÁLISIS DE FUNCIONALIDAD DEL MODELO DE HUESO HUMANO ARTIFICIAL NANOESTRUCTURADO OBTENIDO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.....</b>	<b>84</b>
4.3.1 Análisis morfológico y simetría del cráneo	84
4.3.2 Análisis radiológico de la zona del defecto crítico mandibular	86
4.3.2.1 Análisis cualitativo de la zona del defecto.....	86
4.3.2.2 Análisis cuantitativo de la zona del defecto. ....	87
<b>4.4 ANÁLISIS HISTOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA ZONA DEL DEFECTO CRÍTICO MANDIBULAR .....</b>	<b>90</b>
4.4.1 Análisis histológico de la zona del defecto.	90
4.4.2 Análisis histoquímico de la zona del defecto.	93
<b>5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>101</b>
<b>6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>114</b>
<b>7 ABREVIATURAS .....</b>	<b>118</b>
<b>8 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>120</b>

# INTRODUCCIÓN

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 ANATOMÍA DE LA MANDÍBULA.

El hueso mandibular es el hueso más denso y prominente de la cara en la especie humana; tiene determinadas características importantes; es un hueso impar, plano, central, móvil y simétrico. Se sitúa en la parte inferior y anterior de la cara.

Tiene una forma en herradura con un hueso horizontal y dos ramas ascendentes verticales, una a cada lado del cuerpo (Infante Contreras, 2009).

Los maxilares y junto con ellos la cavidad oral como unidad funcional, han tenido un impacto importante en el desarrollo del linaje y evolución de los vertebrados, especialmente en la especie humana. Además de una herramienta fundamental para conseguir el alimento, con la evolución de la especie se convierte en un elemento indispensable en la comunicación verbal, la expresión de las emociones y la interacción con los demás (Infante Contreras, 2009).

### **CUERPO:**

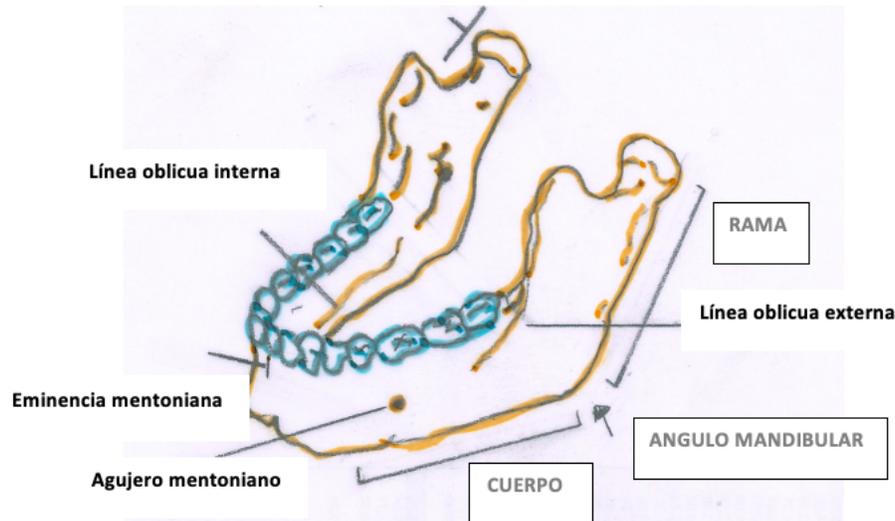
**Cara externa;** (Convexa) justo en el centro presenta la sínfisis mentoniana, que supone la línea de unión de las dos hemicaras.

A cada lado se dibuja la línea oblicua externa que recorre diagonalmente la cara externa y termina en el borde anterior de la rama ascendente.

La eminencia o protuberancia mentoniana formada por varias crestas de osificación, se encuentra en el centro de la cara externa del cuerpo y tiene forma triangular.

A la altura de las raíces de los premolares se encuentra el agujero mentoniano por donde pasa el nervio y los vasos con el mismo nombre.

**Cara interna:** En la línea media tenemos dos pares de apófisis pequeñas denominadas apófisis geni. En las situadas superiormente; insertarán los músculos genioglosos y en las inferiores los geniohioideos.



*Imagen 1: Dibujo propio de la autora: Partes del hueso mandibular.*

A ambos los lados de las apófisis geni, encontramos una depresión o fosita sublingual donde se aloja glándula sublingual.

Debajo de los últimos molares encontramos otra depresión, la fosita submaxilar que contiene a la glándula submaxilar.

Hay una línea que recorre también diagonalmente la cara interna del cuerpo de la mandíbula, en este caso se denomina línea oblicua interna o milohioidea, y servirá para la inserción del musculo milohioideo.

Borde superior o borde alveolar: se alojan los alveólos dentarios con las raíces dentarias.

Borde inferior: a cada lado de la línea media aparece una depresión o “fosa” llamada digástrica, inserción del vientre anterior del músculo digástrico.

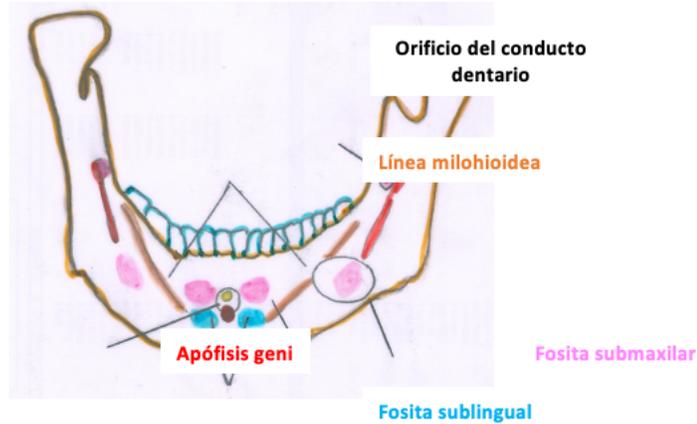


Imagen 2: Dibujo propio de la autora: Cara interna del hueso mandibular

## RAMAS

Parten del cuerpo formando un ángulo de unos 15° denominado ángulo mandibular. Cada una de ellas presenta 2 caras y 4 bordes.

Cada rama en su parte superior tiene a su vez dos procesos separados por la escotadura sigmoidea.

Anterior o apófisis coronoides; inserción del músculo temporal.

Posterior o cóndilo mandibular; donde se forma la articulación temporomandibular, (por delante del canal auditivo externo)

**Cara externa** con numerosas líneas de rugosidades en su parte inferior, donde se inserta el músculo masetero.

**Cara interna;** a nivel medio está el orificio mandibular o orificio del conducto dentario por donde atraviesa los vasos y nervios dentarios inferiores.

Delante de este encontramos la espina de Spix o línula (una laminilla con forma triangular) donde se inserta el ligamento Esfenomandibular.

En la parte ínfero-posterior de esta cara se encuentra un canal muy marcado; el canal o surco milohioideo por donde salen los vasos y nervios milohioideos.

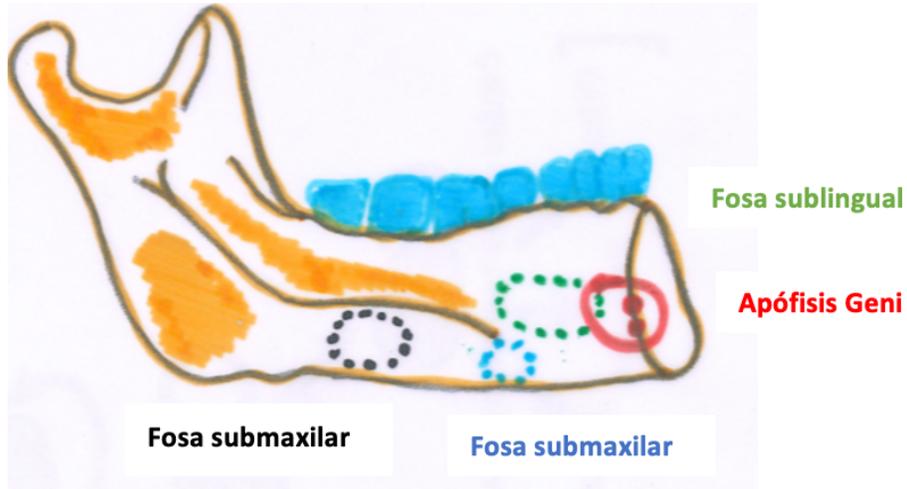


Imagen 3: Dibujo propio de la autora: Partes de la rama mandibular.

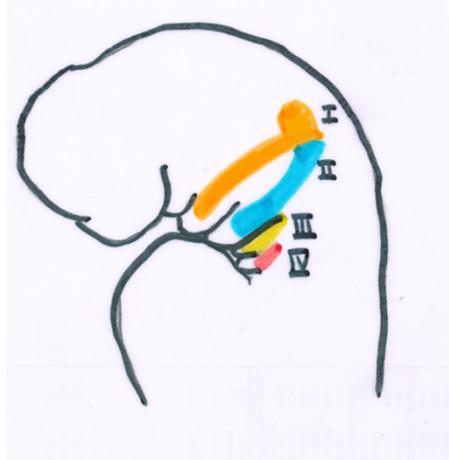
## 1.2 EMBRIOLOGÍA DE LA MANDIBULA.

La característica más típica del desarrollo embriológico de la cabeza y el cuello es la formación de los arcos branquiales (Sadler, 2012).

Estos arcos aparecen durante la cuarta y la quinta semana del desarrollo intrauterino y contribuyen en gran medida al aspecto externo característico del embrión. (Imagen 4)

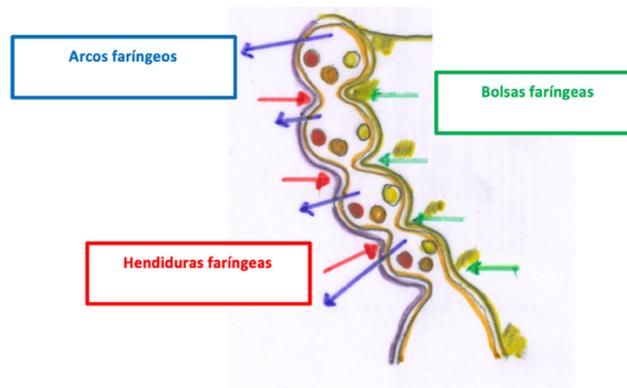
Durante la cuarta semana, la región craneal del embrión humano se asemeja al embrión de un pez, en el mismo momento del desarrollo, esto explica la nomenclatura “branquial” de este periodo, ahora mismo ya obsoleta (Almela Rojo y Iniesta Turpin, 2015).

Los arcos faríngeos o branquiales están formados por un núcleo central de tejido mesenquimal, cubierto en su lado externo por ectodermo superficial y revestido en su interior por epitelio de origen endodérmico. Cada arco está limitado por las correspondientes hendiduras branquiales, por fuera, y bolsas faríngeas, por dentro (Gil et al., 2002) (*Imagen 4*).



*Imagen 4: Dibujo de la autora: Vista lateral de un embrión de 4 semanas. Muestra los cartílagos de los arcos faríngeos que participan en la formación de los huesos de la cara y el cuello. Aspecto característico “branquial”.*

Es característico que cada uno de ellos posea un componente muscular, (para formar los músculos de la cabeza y el cuello), una arteria, nervios motores y sensitivos y un vástago cartilaginoso (que forme el esqueleto del arco) (Peñaloza Salazar y Rodríguez Ramírez, 2019). (*Imagen 5*)



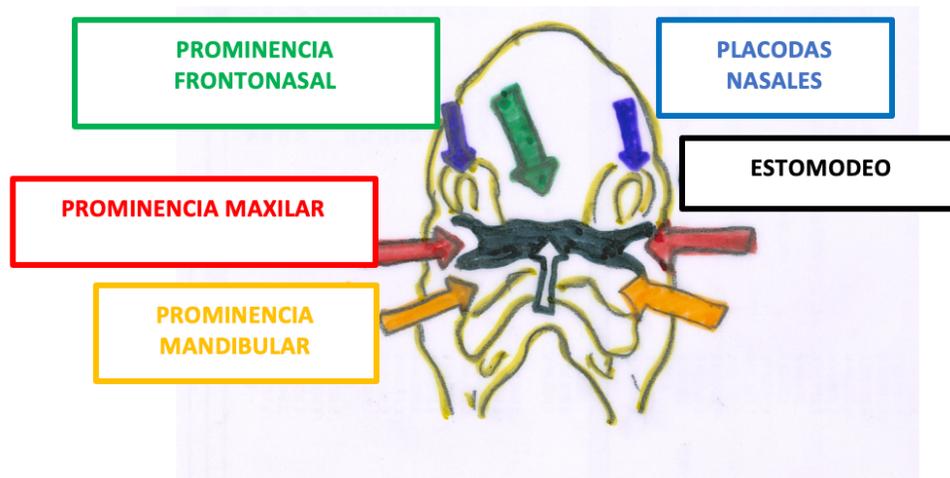
*Imagen 5: Aspecto horizontal de arcos, hendiduras y bolsas faríngeas o branquiales*

En el final de la cuarta semana del desarrollo embrionario, pueden identificarse cinco formaciones mesenquimáticas. (*Imagen 6*)

Los procesos mandibulares caudalmente en relación con el estomodeo y los procesos maxilares lateralmente al estomodeo.

La prominencia frontonasal, elevación ligeramente redondeada, que se encuentra en situación craneal con respecto al estomodeo. El desarrollo de la cara se ve complementado en una etapa posterior con la formación de los procesos nasales.(Almela Rojo y Iniesta Turpin, 2015)

El mesodermo original de cada arco faríngeo forma los músculos de la cara y el cuello. De tal manera, cada arco faríngeo se caracteriza por poseer sus propios componentes musculares, con su propio nervio craneal y, cualquiera que sea el sitio donde emigren las células musculares, llevarán con ellas su componente nervioso. Esto mismo ocurre con la vascularización y cada arco posee su propio componente arterial (Sadler, 2012).



*Imagen 6; Dibujo de la autora: formaciones mesenquimáticas*

De esta manera de cada arco faríngeo se formará parte de la musculatura de la cabeza y cuello con su consiguiente inervación.

El PRIMER ARCO FARÍNGEO va a dar origen a: los músculos de la masticación, vientre anterior del digástrico, milohioideo, musculo del martillo y periestafilino externo. Músculos que van a estar inervados por la rama maxilar inferior del Nervio Trigémino.

El SEGUNDO ARCO FARÍNGEO: va a dar lugar al músculo del estribo, estilohioideo, vientre posterior del digástrico, auricular y músculos de la expresión facial. Todos ellos van a estar inervados por el facial.

La musculatura del TERCER ARCO FARÍNGEO; se circunscribe a los músculos estilofaríngeos, los cuales van a ser inervados por el nervio glossofaríngeo.

Por último, del CUARTO ARCO FARÍNGEO; se formarán; el músculo cricotiroideo, periestafilino externo y constrictores de la faringe, todos ellos inervados por la rama laríngea superior del Nervio Vago.

En cuanto a los componentes cartilagosos, el PRIMER ARCO FARÍNGEO va a estar compuesto por una porción dorsal; PROCESO MAXILAR y una ventral; PROCESO MANDIBULAR.

El tejido mesenquimático del proceso maxilar dará lugar a los huesos; premaxilar, maxilar, hueso cigomático y a una parte del temporal por osificación membranosa.

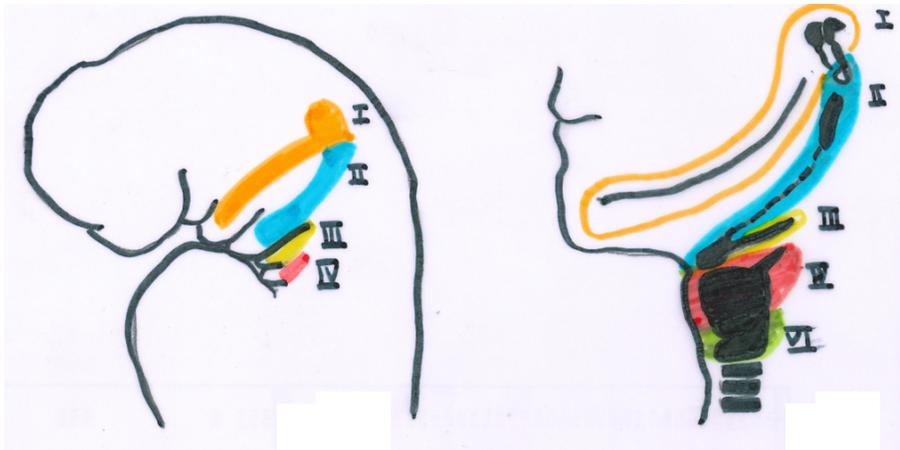
Por otro lado, el proceso mandibular con el CARTÍLAGO DE MECKEL en su interior, el cual durante su desarrollo posterior desaparece excepto en su extremo dorsal, que persiste y forma el yunque y el martillo.

El maxilar inferior o hueso mandibular se forma mediante un proceso de osificación membranosa del tejido mesenquimático que rodea este cartílago de Meckel (Almela Rojo y Iniesta Turpin, 2015).

El cartílago del SEGUNDO ARCO FARÍNGEO o CARTILAGO DE REICHERT, da lugar al hueso estribo, apófisis estiloides, ligamento estilohioideo, asta menor y porción superior del cuerpo del hueso hioides.

El TERCER ARCO FARÍNGEO da origen a la porción inferior del cuerpo y asta mayor del hioides.

El 4º Y 6º ARCO FARÍNGEO se fusionarán para formar los cartílagos de la laringe; Tiroides, cricoides, aritenoides corniculado y cuneiforme.



*Imagen 7: Dibujo de la autora que muestra (A) los cartílagos de los arcos faríngeos en una visión lateral del embrión de 4 semanas y las estructuras definitivas formadas por los componentes cartilagosos de los arcos faríngeos (Gil et al., 2002).*

DERIVADOS DE LOS ARCOS FARINGEOS Y SU INERVACIÓN			
ARCO FARÍNGEO	NERVIO	MÚSCULOS	ESQUELETO
1.Mandibular	Trigémico, división maxilar inferior	De la masticación (temporal, pterigoideo externo) milohioideo; vientre anterior del digástrico; periestafilino externo y del martillo.	Cartílago del cuadrado, yunque, cartílago de Meckel, martillo, ligamento anterior del martillo, ligamento esfenomandibular, porción del maxilar inferior.
2. Hioideo	Facial	De la expresión facial (bucinador; auricular; frontal; cutáneo del cuello; orbicular de los labios y de los párpados; vientre posterior del digástrico; estilohioideo; del estribo	Estribo; apófisis estiloides; ligamento estilohioideo; asta menor y porción superior del cuerpo del hueso hioides.
3	Glossofaríngeo	Estilo-faríngeo	Asta mayor y porción inferior del cuerpo del hioides
4-6	Vago  *R. laríngea superior  * R. laríngea inferior o recurrente	Cricotiroideo; elevador del paladar; constrictor de la faringe	Cartílagos laríngeos (tiroides, cricoides, aritenoides, corniculado y cuneiforme)

*Tabla 1: Derivados de los arcos faríngeos y su inervación*

### 1.3 OSIFICACIÓN DE LA MANDIBULA.

Centrándonos en la embriología del hueso mandibular, será el PRIMER ARCO FARÍNGEO (también llamado MANDIBULAR) el que dará origen al proceso mandibular, que contiene el cartílago de Meckel.

Este cartílago se forma entre la cuarta y quinta semana de vida intrauterina, se localiza uno de cada lado de la línea media, divergen dorsalmente hasta la cavidad timpánica de cada oído medio.

El cartílago de Meckel más tarde servirá como guía o sostén para la osificación de este proceso; y a la vez que se reabsorbe gradualmente será remplazado por una extensión de osificación del hueso membranoso alrededor de él.

La mandíbula es el segundo hueso de todo el organismo, en osificarse, después de la clavícula. El inicio de la formación de tejido óseo se produce a las seis o siete semanas de vida intrauterina.

Se cree que la parte anterior del cartílago de Meckel participa en la sínfisis mandibular, mientras que la posterior, sirve como guía embriológica (un esqueleto cartilaginoso) para la mandíbula embrionaria y desaparece cerca de la semana 24.

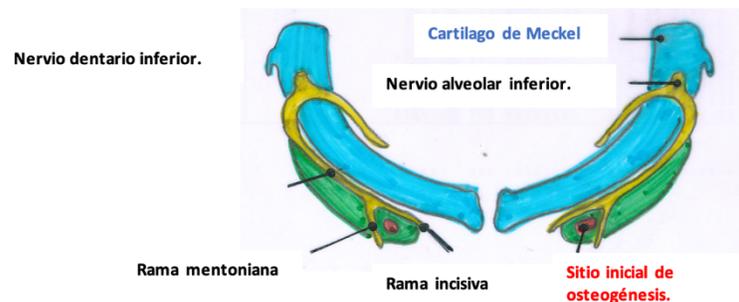


Imagen 8: Dibujo de la autora que muestra; Osificación membranosa de la mandíbula.

Cada mitad comienza el proceso de osteogénesis desde un centro de osificación; cerca del agujero mentoniano, donde más tarde se desarrollará el germen canino. A la

altura del ángulo formado por las ramas del nervio mentoniano y del nervio incisivo, al separarse del nervio mandibular.

La osteogénesis progresa hacia la línea media, lingual y bucalmente para formar un canal alrededor del cartílago y hacia atrás a lo largo de la cara lateral del cartílago de Meckel formando hueso alrededor del nervio dentario inferior. Adicionalmente la formación ósea se extiende hacia arriba, para dar soporte al desarrollo de los gérmenes dentarios y aparecen las láminas alveolares.

La osificación del cuerpo avanza hacia atrás y se detiene en la zona de la línula mandibular desde donde el cartílago de Meckel continúa dentro del oído medio.

El hueso embrionario del cuerpo mandibular tiene el aspecto de un canal abierto hacia arriba, donde se alojan el paquete vásculo-nervioso y los gérmenes dentarios en desarrollo. Mientras tiene lugar el proceso de osificación, el cartílago de Meckel va involucionando excepto en la sínfisis mentoniana. Y finalmente la formación del cuerpo de la mandíbula finaliza cuando el paquete vásculo-nervioso se desvía hacia arriba.

La rama mandibular se forma por una extensión de la osificación desde el cuerpo, hacia atrás y debajo del agujero mentoniano inferior y esto tiene lugar alrededor de las doce semanas de VIU. Aparecen otros centros de cartílago para la osificación endocondral de las ramas mandibulares. Existen cuatro centros cartilaginosos secundarios: el coronoides, el incisivo (sinfisial o mentoniano), el condilar y el angular. Los sitios donde aparecen estos cartílagos secundarios de osificación, tomarán inserción de los músculos masticadores.

Generación de un sustituto óseo humano mediante ingeniería tisular para el tratamiento de defectos mandibulares.

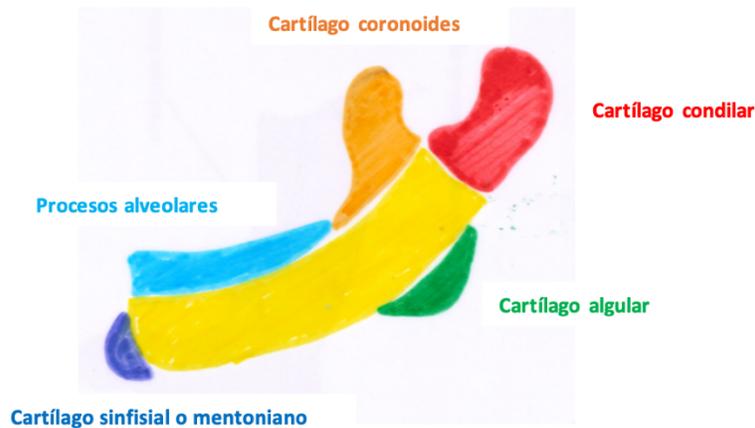


Imagen 9: Dibujo de la autora que muestra centros de cartilago para la osificación endocondral de la mandíbula.

El condíleo es el de mayor tamaño y el que tiene el papel más importante en el crecimiento de la rama mandibular, además de jugar un papel definitivo en la morfogénesis de la articulación definitiva.

Durante la vida fetal las dos mitades de la mandíbula están unidas por una sínfisis fibrocartilaginosa, llamada sincondrosis que se suelda definitivamente al tercer mes de vida extrauterina.

El hueso reticular inicial formado a lo largo del cartilago de Meckel es reemplazado por hueso lamelar, y alrededor del quinto mes de VIU aparecen los sistemas de Havers.

Por tanto la mandíbula tiene dos tipos de osificación (Meruane et al., 2012):

Osificación intramembranosa: Se realiza a expensas de mesénquima.

Osificación endocondral: el molde de cartilago hialino es el que guía la formación ósea.

Se dice que la mandíbula tiene un mecanismo de osificación yuxtaparacondral (Yuxta=al lado, para=paralelo; cóndros=cartílago). En el que el cartílago de Meckel, sirve como guía o sostén, pero no participa (Peñaloza Salazar y Rodríguez Ramírez, 2019).

#### **1.4 HISTOLOGÍA DEL PERIODO DE OSIFICACIÓN MANDIBULAR**

Para resumir histológicamente el mecanismo de obtención de hueso primario utilizaremos un fragmento de mandíbula fetal en periodo de osificación con una tinción. *(Imagen 10)*

La matriz ósea se ve de color azulado tras la desmineralización, y en su interior pueden verse osteocitos. En la superficie de las trabéculas en formación ribetes epiteloideos de osteoblastos se encargan de ir incrementando el tamaño del hueso en formación. En otras áreas ya se han iniciado los mecanismos resortivos del hueso a expensas de la actividad de los osteoclastos. El tejido circundante muy bien vascularizado está poblado por células indiferenciadas en las proximidades de la zona ósea en formación. Se trata de elementos osteoprogenitores, y de ellas derivará todo el linaje de los osteoblastos, osteocitos y células de las superficies óseas.

Generación de un sustituto óseo humano mediante ingeniería tisular para el tratamiento de defectos mandibulares.

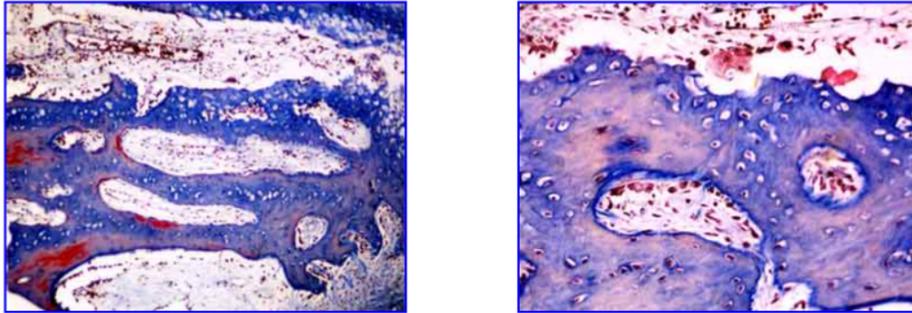


Imagen10. (a)(b): Fragmento de mandíbula fetal. (Tricrómico x10(a) y x20(b) aumentos; (Práctica de Histología en Odontología UV

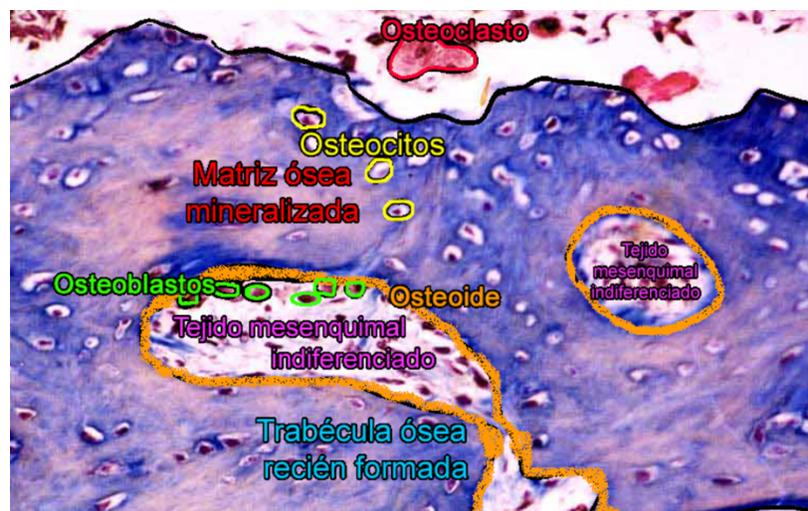


Imagen10. (c): Esquema explicativo de los elementos histológicos más importantes que intervienen en la osificación mandíbula

## 1.5 PATOLOGÍA DE LA REGIÓN MAXILOFACIAL.

En la cirugía oral y maxilofacial se puede ver una gama muy diversa de defectos que requieren la restitución de tejido óseo; desde los defectos óseos a que da lugar la extracción de un diente, hasta las grandes pérdidas de hueso resultantes de infecciones, traumatismos o resecciones oncológicas (Tüz et al., 2019).

La (tabla 2) recoge las patologías más frecuentes relacionadas con pérdida de sustancia ósea mandibular:

La PERIODONTITIS es sin duda, el principal factor etiológico de la pérdida de hueso alveolar. Puede llevar aparejada la pérdida ósea cuando la inflamación o infección de las encías no se trata y el problema se va haciendo cada vez más grave.

La REABSORCIÓN DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN DEL DIENTE. Tras la destrucción del hueso cortical en el momento de la extracción del diente o previamente, por distintas etiologías odontológicas como; la enfermedad periodontal, alteraciones del desarrollo, abscesos, apicectomías, fracaso de implantes, fracturas dentales... Tiene lugar una deformidad del proceso alveolar de distintos grados como resultado del proceso de cicatrización (Valenzuela Donoso, 1947).

Las LESIONES DE ORIGEN TRAUMÁTICO que afectan al macizo facial, suponen un importante problema de salud a nivel mundial, del que derivan importantes alteraciones funcionales y estéticas con una repercusión económico y social importantes asociadas (Mardones et al., 2011).

Las fracturas maxilofaciales en hombres de 20-30 años de edad son frecuentes y se deben principalmente a caídas y accidentes de tráfico (De la Peña-Brambila y Miranda-Díaz, 2016).

En concreto las fracturas del tercio inferior del rostro (hueso mandibular) son las segundas más frecuentes en esta región.

Las lesiones traumáticas a este nivel, además de generar defectos óseos importantes con difícil tratamiento quirúrgico, conllevan importantes alteraciones clínicas asociadas, en muchas ocasiones; como la maloclusión, pérdida del contorno del arco dentario, laceración de tejidos gingivales, alteración de la sensibilidad por compromiso del nervio alveolar inferior, presencia de hematomas y alteración en la dinámica mandibular (Miloró et al., 2004).

<b>ETIOLOGÍAS QUE SUPONEN PÉRDIDA DE TEJIDO ÓSEO MANDIBULAR</b>
<b>Periodontitis</b>
<b>Reabsorción después de la extracción dentaria</b>
<b>Traumatismo máxilo-facial</b>
<b>Osteomielitis</b>
<b>Osteonecrosis farmacológica</b>
<b>Tumores primarios y resecciones oncológicas agresivas</b>
<b>Malformaciones congénitas</b>

Tabla 2: Patología más frecuente relacionada con pérdida de sustancia mandibular.

La OSTEOMIELITIS MANDIBULAR: la osteomielitis de los maxilares tiene como origen principal la caries dental, con predominio en la mandíbula. Se da generalmente, como resultado de una complicación de infecciones odontógenas, periodontales o tras la extracción de piezas dentarias; siendo la vía hematógena otra posible causa de osteomielitis a este nivel, aunque mucho menos frecuente (Valenzuela Donoso, 1947).

La etiología más común es bacteriana (siendo los microorganismos aislados más comunes; el *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides sp*, *aeróbicos Gram negativos*, además de *Streptococcus*)

La osteomielitis en esta localización se considera muy poco frecuente (en comparación con las de los huesos largos), así como de una incidencia baja, teniendo además en cuenta, lo frecuente que son las infecciones y los traumatismos a este nivel.

La OSTEONECROSIS DE LOS MAXILARES: El daño tisular inducido por la medicación es otra etiología que puede relacionarse con afectaciones importantes a nivel de los maxilares.

Definimos como OSTEONECROSIS MANDIBULAR RELACIONADA CON MEDICAMENTOS (ONMRM) al síndrome asociado al uso de fármacos antirresortivos (bifosfonatos), inhibidores de ligando RANK-L y de la angiogénesis, administrados para

el tratamiento de algunas enfermedades como pueden ser el cáncer o la osteoporosis (Fernández M et al., 2018).

Los TUMORES PRIMARIOS DE LA REGIÓN MAXILOFACIAL son poco frecuentes, pero en algunos casos el tratamiento conlleva una conducta agresiva, con cirugías de resección que ocasionan un daño importante en los tejidos. Estas cirugías suponen alteraciones físicas, estéticas y psicológicas. Incluso en algunas ocasiones, cuando tiene que ser realizadas en pacientes jóvenes, modifican el desarrollo y crecimiento de la cara siendo en este caso más graves las secuelas (Mercado Montañez, 2017).

Las MALFORMACIONES CONGÉNITAS que afectan al hueso de la mandíbula, son un espectro amplio de afectaciones de distintos grados, que pueden ir desde hipoplasias mandibulares leves sin repercusión morfológica ni funcional, hasta discontinuidades de partes blandas y óseas importantes, en el contexto de fisuras craneofaciales complejas (Cifuentes, 2018).



*Imagen 11: Paciente con secuencia de Pierre Robin en seguimiento en la unidad de malformaciones cráneo-faciales del HUVN.*

La FISURA ALVEOLAR ASOCIADA EN PACIENTES CON FISURAS PALATINAS. La fisura labio-palatina (FLP), es la malformación de la región orofacial más frecuente, con una incidencia en nuestro medio aproximadamente de 1 de cada 700 recién nacidos vivos (Al-Ruwaiti et al., 2014; Gironés Camarasa et al., 2018).

Aproximadamente un 75% de los pacientes con FLP tienen asociada una fisura alveolar (FA).

(FA) y el cierre de la FA residual o alveoloplastia secundaria se encuentra totalmente aceptado en el tratamiento integral de estos pacientes. El injerto óseo alveolar permite restaurar la morfología y función normal de los arcos y aporta un apoyo periodontal adecuado para la preservación de los dientes adyacentes a la hendidura. El injerto de cresta iliaca es el más frecuentemente utilizado, aunque la calota craneal y en general injertos óseos autólogos craneofaciales pueden ofrecer resultados superiores como comentaremos en el apartado de injertos autólogos (Yang et al., 2019).



*Imagen 12: Paciente con fisura labio-palatina bilateral tratado en la unidad de malformaciones craneofaciales del HVN*

## **1.6 TRATAMIENTOS ACTUALES DE LOS DEFECTOS MANDIBULARES.**

La anatomía craneofacial es compleja; por este motivo, las fracturas mandibulares a menudo pasan desapercibidas, se diagnostican mal o se tratan inadecuadamente (Carr et al., 1994).

Además; como ya hemos visto en el apartado anterior, son varias las condiciones y patologías (*tabla 2*) que pueden afectar significativamente la región oral y maxilofacial, con una pérdida significativa de tejido óseo asociada. Estos grandes defectos que afectan a la mandíbula son muy difíciles de manejar por las características histológicas y fisiológicas únicas que posee, y ocasionan severos problemas funcionales y estéticos, que van a precisar en muchas ocasiones tratamientos complejos (Graves et al., 2011; Bernardi et al., 2020).

Los avances en las técnicas quirúrgicas y el empleo de injertos óseos han mejorado significativamente estos resultados mejorando la funcionalidad posterior, así como los resultados estéticos (De la Peña-Brambila y Miranda-Díaz, 2016).

En la mayoría de los casos, los defectos se reparan mediante injertos óseos obtenidos de manera autóloga (es decir, del propio paciente) o de donantes cadavéricos con resultados más controvertidos.

El hueso cortico esponjoso autólogo representa el material ideal para la reconstrucción, pues aporta biocompatibilidad total, tiene un elevado potencial osteogénico y una gran resistencia mecánica y a la infección, todo lo que se traduce en una rápida consolidación.

Para la reconstrucción de defectos mandibulares, se han probado numerosos biomateriales inertes. Específicamente, varios tipos basados en bioformulaciones de fosfato de calcio (especialmente fosfato tricálcico e hidroxiapatita), que han tenido resultados muy prometedores, aunque ninguno de estos ha demostrado ser completamente eficiente como inductor de la regeneración de hueso (Basyuni et al., 2020).

Un injerto ideal debe ser biocompatible, capaz de inducir la regeneración ósea, y ocasionar los menores efectos secundarios o complicaciones en el huésped. Es

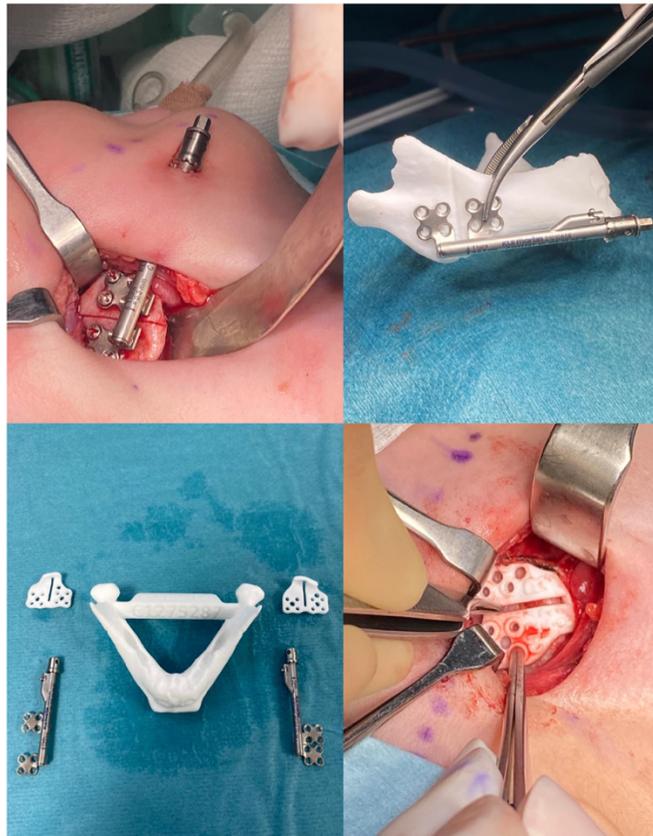
importante que permita que las células del huésped remodelen el injerto y lo reemplacen por tejido óseo neoformado. Sin embargo, la mayoría de los biomateriales disponibles actualmente carecen de algunas de estas propiedades, lo que hace necesario buscar nuevos materiales capaces de inducir una regeneración ósea eficaz (Giannoudis et al., 2005).

### **DISTRACCIÓN ÓSEA**

La distracción osteogénica mandibular ha demostrado ser una opción eficiente para la reparación de tejido óseo a este nivel. Se basa en el uso de fuerzas mecánicas, aportadas por un distractor, sobre una osteotomía o fractura ósea controlada, que consigue la formación de hueso nuevo. Este se acompaña de una expansión simultánea de los tejidos blandos circundantes lo que se conoce como; histogénesis por distracción. (Martín-masot et al., 2017)

La distracción osteogénica mandibular se considera el tratamiento de elección en microrretrognatia severa del adulto donde con el alargamiento mandibular, se consigue aliviar la obstrucción de la vía aérea. También en los pacientes con malformaciones craneofaciales; como puede ser la secuencia Pierre Robin con retro/micrognatia grave, la distracción mandibular se considera la mayoría de las veces el tratamiento de elección (Martín-masot et al., 2017; Cifuentes, 2018).

Las principales limitaciones; son el número de intervenciones quirúrgicas que acompañan a la distracción de la mandíbula, así como la dificultad para controlar el vector de distracción cuando los defectos óseos son complejos tridimensionalmente hablando. Por ello a pesar de ser una técnica tan utilizada en la reconstrucción de defectos lineales de la mandíbula tiene poca aplicabilidad en el campo de los defectos orbito maxilares (Kessler et al., 2003; Bertelè et al., 2005).



*Imagen 13: Distracción mandibular realizada en nuestro centro en un paciente pediátrico con secuencia Pierre Robin. (A) Distractor implantado en el paciente tras osteotomía. (B) Esquema preoperatorio con estereolitografía (C) Materiales a utilizar; distractores, modelo 3D, férula para osteotomía. (D) Férula para la realización fractura ósea mandibular segura.*

### **INJERTOS ÓSEOS**

Existen tres formas primarias o tipos de injertos óseos. El origen y composición de cada uno normalmente determina el mecanismo por el cual actúan.

**AUTOINJERTOS O INJERTO AUTÓLOGO:** Es hueso del propio paciente. Material orgánico, vivo, obtenido del huésped en el momento mismo del procedimiento quirúrgico. Mediante osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción permite la formación de nuevo hueso, por eso, está considerado como el “injerto ideal”, pues es el único que tiene propiedades osteogénicas.

Actualmente la técnica Gold standard para el tratamiento de defectos óseos es el trasplante de hueso autólogo (Autoinjertos donde el donante y receptor del injerto son el mismo individuo) Sin embargo son muchas sus limitaciones (Gallego et al., 2010):

- Morbilidad significativa de la zona donante, a pesar de los avances a todos los niveles en el manejo de estos pacientes (diagnóstico por imagen, anestésicamente, técnicas quirúrgicas...) (Hadlock et al., 1998).
- Escasez en cuanto a su disponibilidad.
- La morfología anatómica del mismo.
- Se produce una pérdida impredecible del volumen del injerto óseo durante el proceso de remodelación, que es mayor cuando los defectos son mayores (6-9 cm), o cuando el tejido circundante no provee el suficiente aporte sanguíneo, como consecuencia a la propia cicatrización, infección, o radiación (De la Peña-Brambila y Miranda-Díaz, 2016).

Hay estudios que defienden que los injertos óseos autólogos craneofaciales ofrecen resultados superiores a los injertos de huesos largos en la reconstrucción de defectos óseos maxilofaciales, pero el mecanismo responsable de esta superioridad aún no se ha ilustrado con claridad (Yang et al., 2019).

Por tanto, en este momento la utilización de colgajos microvasculares representa la mejor solución para defectos amplios de hueso y tejido blando en la región maxilofacial. El sitio donador se elige dependiendo de la cantidad y tipo de hueso deseado.

**Cresta iliaca:** es uno de los sitios más comunes para obtener tejido cortical, medular y corticomedular.

Generación de un sustituto óseo humano mediante ingeniería tisular para el tratamiento de defectos mandibulares.



Imagen 14: Reconstrucción mandibular con injerto de cresta iliaca anterior. Paciente tratado en la unidad de malformaciones craneofaciales del HVN

**Colgajo microquirúrgico del hueso peroné:** el peroné es un hueso largo y delgado, con capacidad de carga, proporciona aproximadamente 25 cm de hueso, lo que permite reconstruir cualquier defecto mandibular, por este motivo se considera de elección para las prótesis mandibulares de más de 9 cm de longitud.

La tasa de éxito del injerto óseo vascularizado es alta, por la irrigación garantizada por el pedículo vascular del colgajo, motivo que lo hace también de elección en el tratamiento de paciente irradiados previamente o cuando se requiere reemplazo simultáneo de tejido blando (Pogrel et al., 1997).

Como desventajas este tipo de injertos alargan los tiempos quirúrgicos y aumentan la comorbilidad asociada por los déficits permanentes que ocasionan; de fragmentos de hueso, así como músculos, cuando se incluyen colgajos musculares.

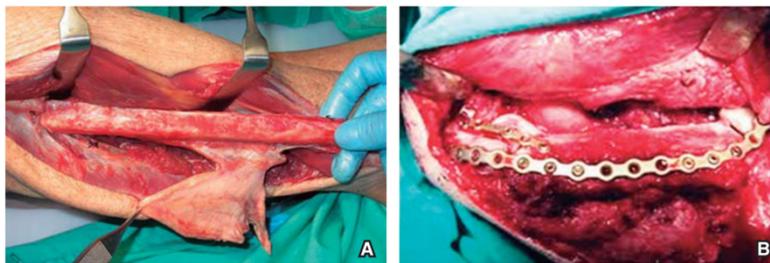
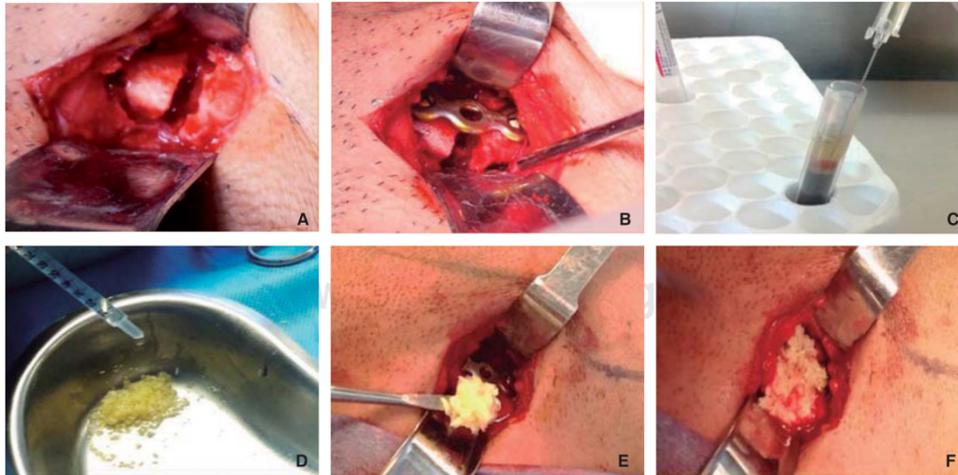


Imagen 15: Colgajo microquirúrgico de peroné. (A)(B). (De la Peña-Brambila y Miranda-Díaz, 2016).

**ALOINJERTOS:** Injertos óseos obtenidos de individuos de la misma especie, pero con un genotipo distinto al del huésped. Generalmente de cadáveres procesados bajo medidas de esterilidad y almacenados en bancos de hueso. Durante su preparación se

reduce considerablemente el potencial antigénico. Esta preparación se puede llevar a cabo de tres formas; pasteurizado, auto clavado y congelado. Diversos autores señalan que la mayoría de los aloinjertos se reabsorben e incorporan completamente pasadas las 4 semanas.



*Imagen 16: Utilización de la mezcla de hueso liofilizado adicionado con plasma rico en plaquetas en un defecto mandibular izquierdo(A)(B)(C)(D)(F). (De la Peña-Brambila y Miranda-Díaz, 2016).*

La principal desventaja de los aloinjertos es su pobre capacidad de osteoconducción y osteoinducción en comparación con los injertos autólogos. Tienen una tasa elevada de reabsorción, que puede traducirse en fracturas patológicas, así como en problemas de integración de los injertos.

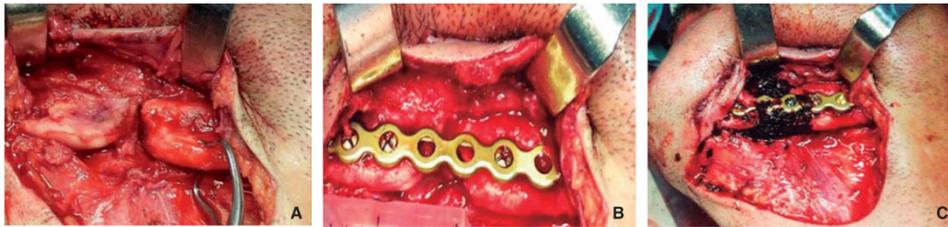
Por otro lado, los aloinjertos que no han sido procesados al igual que ocurre con los xenoinjertos presentan dos connotaciones negativas: la posibilidad de rechazo inmunológico y el riesgo de transmisión de enfermedades.

**XENOINJERTOS:** Tejido óseo obtenido de especies diferentes a la del huésped (bovinos, porcinos, caballar, etcétera). Los sustitutos óseos derivados de bovinos han sido, por mucho los más utilizados, en especial en el campo de la odontología. El principal material utilizado es la hidroxiapatita de origen bovino (hueso bovino inorgánico desproteinizado). Son muchas las complicaciones asociadas a este tipo de

injertos como: sinusitis y patologías del hueso maxilar, desplazamiento de los materiales del injerto, falla del implante, reacción de cuerpo extraño, encapsulación del material, inflamación crónica, fenestraciones de tejidos blandos y quistes asociados, siendo en ocasiones muy dificultosa la retirada quirúrgica del material.

**INJERTOS ALOPLÁSTICOS O SUBSTITUTOS SINTÉTICOS DE HUESO:** En las últimas décadas son muchos los estudios enfocados en los materiales cerámicos como la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico, así como en algunos polímeros. La mayoría de ellos son únicamente osteoconductores. Por ello se utilizan cada vez más en procedimientos de preservación del proceso alveolar en momento de realizar una extracción dental para evitar el colapso del reborde. Los materiales aloplásticos tienen diferentes propiedades que los hacen indicados o no para cada aplicación específica.

Entre las desventajas; las partículas pueden quedar separadas del hueso existente, dispersas en los tejidos blandos cercanos, incluso rodeadas de tejido fibroso.



*Imagen 17: Injerto aloplástico de quitosana y fosfato tricálcico. (A)(B)(C). (De la Peña-Brambila y Miranda-Díaz, 2016).*

La hidroxiapatita representa el componente mineral inorgánico primario y natural del hueso.

Son muchas las presentaciones en que se ha comercializado. Se utiliza como injerto óseo dada sus propiedades osteoconductivas y estimuladoras de proliferación celular, lo que proporcionando condiciones favorables para la regeneración tisular (Rodríguez y Nowzari, 2020).

El uso clínico de hidroxiapatita para la cicatrización ósea ha tenido muy buenos resultados, principalmente en seno maxilar, para ganar altura ósea para la realización de implantes dentales.

Tiene una tasa de éxito a largo plazo muy buena, tanto cuando se utiliza sin mezclas, como cuando se combina con otros materiales como PRP(plasma rico en plaquetas, hueso autólogo u otros materiales, variando el rango de efectividad en función del material al que se asocie (Gehrke et al., 2007).

MODELOS ESTEREOLITOGRAFICOS: La estereolitografía es una herramienta más, que se ha incluido en la planificación quirúrgica, especialmente en aquellas especialidades más complejas como puede ser la cirugía maxilofacial.

Consiste en la realización de estructuras, prototipos o modelos físicos sólidos en tres dimensiones, pueden estar realizados a escala o ser de tamaño real con una alta precisión y exactitud (Chopra et al., 2014).

En el campo de la cirugía maxilofacial supone una herramienta útil en el estudio de las relaciones del macizo facial, permitiendo una visualización integral de las mismas. Esta herramienta puede ser empleada como simuladores quirúrgicos, con su consecuente utilidad en la formación académica (Ernesto et al., 2012).

Todo esto aporta predicción, efectividad y seguridad quirúrgica que se traduce en resultados cada vez más óptimo de los tratamientos quirúrgicos y la disminución de los tiempos de las cirugías (Prada-Madrid, 2018).



*Imagen18: Esquema preoperatorio generado con estereolitografía tratado en la unidad de malformaciones craneofaciales del HVN*

## **1.7 CONCEPTOS FUNDAMENTALES EN REGENERACIÓN ÓSEA**

La osteogénesis es el proceso de formación o desarrollo del tejido óseo. Cuando hablamos de osteogénesis, nos referimos a la formación de hueso nuevo, independientemente de la procedencia de las células a partir de las cuales se lleve a cabo. Es un fenómeno común en el proceso de curación ósea (Albrektsson y Johansson, 2001).

Cuando se realiza un injerto de hueso, tiene lugar un proceso de regeneración ósea, mediante osteogénesis sobre la zona receptora del injerto. Esto puede llevarse a cabo partir de células del propio injerto (más común en los injertos de hueso autólogo) u originarse a partir de las células de la zona receptora.

**OSTEOINDUCCIÓN:** Se define como el proceso de inducción de la osteogénesis. Tiene lugar por un reclutamiento de células inmaduras y su estimulación hacia el desarrollo de preosteoblastos, un linaje celular formador de hueso.

Tanto el hueso como los tejidos que lo rodean contienen células indiferenciadas que pueden ser reclutadas para transformarse en células osteoprogenitoras. Algo fundamental en el proceso de curación. Es decir, con las señales adecuadas; una célula

mesenquimal indiferenciada puede convertirse en un preosteoblasto con capacidad de formación de tejido óseo.

Existen distintos agentes inductivos que pueden llevar a cabo la osteoinducción; los estímulos físicos (como el estrés mecánico y/o algún tipo de señal eléctrica) o elementos químicos glicoprotéicos, más conocidos como factores de crecimiento (BMP) (Dealler, 1981; Solheim, 1998; Albrektsson y Johansson, 2001).

Los BMP (proteínas morfogénicas óseas), de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), son los únicos factores de crecimiento conocidos que han demostrado conseguir la formación ósea en lechos heterotópicos (en los que habitualmente no hay formación de tejido óseo). Es decir, conseguir que las células mesenquimales no diferenciadas se diferencien en osteoblastos (osteoinducción) con la consecuente formación de hueso.

OSTEOCONDUCCIÓN: Se refiere al crecimiento del tejido óseo sobre una superficie. Una superficie será más osteoconductiva en la medida que permita el crecimiento del hueso sobre ella o hacia su interior a través de poros, canales o conductos. Este crecimiento óseo es llevado a cabo por células óseas diferenciadas, que pueden provenir de preosteoblastos locales activados o de células mesenquimales indiferenciadas reclutadas en la osteoinducción.

Por tanto, para que tenga lugar el proceso de osteoconducción ha tenido que haberse producido la osteoinducción. Para que tengan lugar estos procesos, resulta fundamental la vascularización del nuevo tejido óseo. De esta forma, muchos de los factores de crecimiento que influyen en el metabolismo óseo (comentados con anterioridad) colaboran en el mismo, además de con su actividad mitogénica, con su función angiogénica.

En la cirugía tanto de implantes, como de injertos óseos, la osteoconducción es un fenómeno muy común, que no sólo dependerá de las condiciones para la reparación del tejido, sino también del tipo de materiales utilizados. Por ello los materiales de implantes de baja biocompatibilidad, como el cobre, la plata y el cemento óseo, muestran poca o ninguna osteoconducción.

**OSTEOINTEGRACIÓN:** La osteointegración es el anclaje estable de un implante logrado mediante el contacto directo de hueso a implante, es decir el contacto directo (observado con microscopía óptica) entre el material implantado y el hueso vivo en el que se implanta.

La osteointegración no es un fenómeno aislado, sino que depende de la osteoinducción y osteoconducción previas. Por tanto, aquellos materiales que sean demasiado tóxicos para permitir estos dos últimos procesos no podrán integrarse adecuadamente en el hueso. En este contexto para que la osteointegración se pueda lograr y mantener son necesarios: una cuidadosa técnica quirúrgica, un largo tiempo de curación y una distribución de estrés adecuada.

## **1.8 DEFECTO ÓSEO CRÍTICO**

Ya en 1986 Schmitz describió el concepto de defecto óseo de tamaño crítico (del inglés; critical size defect) como el defecto óseo más pequeño que no cicatrizará espontáneamente durante toda la vida del animal. La tasa de reparación ósea varía significativamente entre especies, por eso este defecto crítico es específico para cada especie animal e incluso para cada tipo de hueso.

La capacidad auto regenerativa de un defecto óseo depende de forma directa del tamaño del defecto, y es por eso que, a la hora de evaluar la capacidad osteogénica de cualquier tipo de material, será imprescindible crear un defecto óseo lo suficientemente grande como para que no cicatrice espontáneamente. Si podemos demostrar que un

biomaterial o injerto óseo es capaz de producir la regeneración de un defecto de estas características, estaremos probando su capacidad osteogénica (Schmitz y Hollinger, 1986).

No existe consenso entre los investigadores para elegir un modelo experimental apropiado para la investigación ósea maxilofacial. En la literatura existen muchos modelos animales utilizados para evaluación del potencial osteogénico de diversos biomateriales, y no en todos los casos se ha elaborado correctamente.

Vamos a centrarnos en el hueso mandibular de las ratas, que será donde se llevará a cabo nuestro estudio.

Echando un vistazo a la bibliografía al respecto, para localizar los modelos de investigación que han sido utilizados, vemos que se ha demostrado que defectos circulares de 4 mm de diámetro de espesor total, en la rama mandibular de ratas de tres meses no se curan espontáneamente (Kaban et al., 1979; Kaban y Glowacki, 1981; Schmitz y Hollinger, 1986; Cagigal et al., 2008).

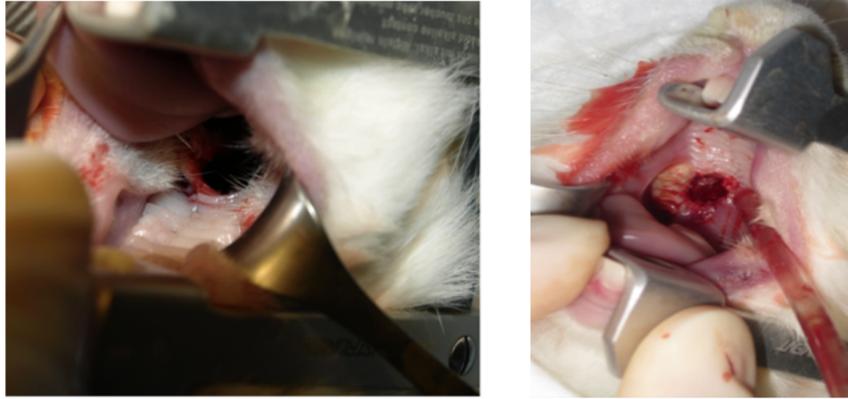
En este contexto, estudios previos, con finalidades similares a las nuestras han utilizado ratas atómicas y crearon defectos óseos mandibulares circulares de 5 mm (Streckbein et al., 2013).

Como hemos dicho anteriormente esto es variable entre especies, y por ejemplo en la mandíbula canina el defecto de tamaño mínimo que no se curaría (el defecto de tamaño crítico) es de 15 mm cuando se retira el periostio y 50 mm cuando se conserva el periostio (Huh et al., 2005).

En estudios anteriores de nuestro equipo de investigación, se han realizado modelos de defecto óseos críticos. Por ejemplo, en el contexto de desarrollar un sustituto multicapa para defectos del paladar, este defecto óseo crítico se realizó en el

Generación de un sustituto óseo humano mediante ingeniería tisular para el tratamiento de defectos mandibulares.

paladar de conejos creándose un defecto osteo-mucoso de espesor total de 4 mm de diámetro.



*Imagen 19: modelo de defecto en paladar de conejos en un estudio previo para el desarrollo de un sustituto multicapa para los defectos de paladar. (Martín-Piedra et al., 2017)*

## **1.9 TERAPIAS AVANZADAS E INGENIERÍA TISULAR.**

### **1.9.1 CONTEXTO ACTUAL DE LA INGENIERÍA TISULAR**

Las terapias avanzadas, incluyendo la terapia celular, la terapia génica y la ingeniería de tejidos, han posibilitado el tratamiento de gran número de patologías que hasta el momento no contaban con una alternativa terapéutica viable. En concreto, las técnicas de ingeniería tisular permiten generar tejidos artificiales capaces de reemplazar tejidos y órganos dañados; estimulando, además, la capacidad regenerativa intrínseca del organismo.

La ingeniería tisular es un campo novedoso que combina y aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida para desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular; es decir la actividad de los tejidos u órganos perdidos o dañados.(Langer y Vacanti, 1993)

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

Para generar estos nuevos tejidos la Ingeniería Tisular emplea tres herramientas básicas, que suponen la tríada de la IT (Bonassar y Vacanti, 1998):

- Células con capacidad de replicación (células madre o troncales).
- Matrices extracelulares (biomateriales).
- Factores de crecimiento (moléculas bioactivas).

Se requiere la combinación armoniosa entre células y materiales; ya que las células sintetizan proteínas necesarias para el desarrollo de la matriz extracelular, y a la vez ésta proporciona un ambiente adecuado para la proliferación de las células.

Por su parte, los factores de crecimiento facilitan y promueven la regeneración del nuevo tejido. Siendo, por tanto, fundamental incorporar factores de crecimiento que promuevan el desarrollo homogéneo y tridimensional de las células, simulando las características propias del tejido natural. De esta forma se garantizará la correcta estructura molecular y macroscópica de los tejidos, requisito indispensable para su correcta función. Además; en muchas ocasiones estos factores de crecimiento, tienen propiedades angiogénicas, facilitando además la vascularización a nivel local (Orive et al., 2003).

Aunque se han introducido varios avances importantes en el campo de la medicina regenerativa ósea, las terapias actuales más comunes siguen siendo los injertos óseos, con sus limitaciones. La ingeniería tisular ósea (ITO) pretende ser una opción en las terapias de regeneración ósea sin las connotaciones negativas de la realización de injertos de hueso.

A diferencia del enfoque clásico de biomateriales, la ingeniería tisular, se basa en la formación y regeneración de tejidos, y tiene como objetivo inducir nuevos tejidos funcionales, en lugar de simplemente implantar nuevas piezas de repuesto.

La aplicación clínica de la ITO sería muy interesante ya que mejoraría los métodos de regeneración ósea, reduciría los costes y el trauma quirúrgico que supone para los pacientes este tipo de cirugía.

Sería ideal la capacidad de utilizar células formadoras de hueso del propio paciente en un constructo biológicamente activo y mecánicamente sano, que fuera implantado

en el paciente sin las cirugías de extracción de un injerto óseo, o al implante de un dispositivo.

Quirúrgicamente el constructo celular se implantaría con técnicas de fijación convencionales en un lecho viable de tejido huésped, con tal de evitar la necrosis tisular local, y la formación de tejido cicatricial avascular denso (Burg et al., 2000).

Son muchos los estudios, y con ello los grupos de investigación, que se encuentran intentando desarrollar diferentes sustitutos biológicos con diferentes aplicaciones clínicas.

Para la creación de diferentes tipos de tejidos; una de las posibles alternativas es el uso de biomateriales orgánicos basados en componentes naturales como la fibrina humana, que se sabe que tienen una alta biocompatibilidad y se han utilizado con éxito en múltiples aplicaciones, en concreto, el Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada ha diseñado y patentado previamente (patente del SAS y de la Universidad de Granada, P200930625 y P200930943) un biomaterial nanoestructurado de fibrina-agarosa altamente biocompatible que permite el crecimiento y la proliferación celular en su interior y que ha sido utilizado con éxito para la generación de distintos tipos de tejidos, incluyendo la córnea, piel, mucosa oral y el hueso palatino (Alaminos et al., 2006; Carriel et al., 2012; Garzón et al., 2013; Martín-Piedra et al., 2017).

Sin embargo, el mencionado biomaterial no ha sido evaluado aún para el tratamiento de defectos óseos mandibulares, los cuales presentan alta prevalencia y son muy difíciles de tratar debido a la limitada capacidad regenerativa del hueso mandibular humano.

Otra alternativa en la elaboración de este tipo de tejidos con otro tipo de biomateriales altamente compatibles, fué la utilizada por el grupo de investigación de la universidad de Valladolid; en el que elaboraron un *scaffold* protéico obtenido a partir

de la albúmina de suero humano donde fueron sembradas células osteoblásticas obtenidas a partir de tejido óseo alveolar humano. Todo ello para estudiar la regeneración ósea mandibular en ratas inmunoincompetentes (Cagigal et al., 2008). Grupo de investigación que ya tenía estudios previos muy esperanzadores en el uso de membranas biodegradables asociadas a biomateriales de relleno consiguiendo potenciar el efecto regenerativo defectos de hueso mandibular en ratas (Gallego et al., 2010).

La ingeniería tisular es una alternativa prometedora que puede facilitar la regeneración ósea en pequeños defectos de tejido, así como en grandes defectos mandibulares. En una revisión sistemática publicada en 2020 al respecto, se evaluó la aplicabilidad in vivo de la IT en la reconstrucción de defectos mandibulares en modelos animales (Basyuni et al., 2020).

De los 72 estudios que incluye la revisión, solo dos emplearon la osteonecrosis como modelo de lesión mandibular, en el resto se creó un defecto crítico. Los fosfatos de calcio (fosfato tricálcico y la hidroxiapatita), fueron los andamios más utilizados. La combinación de los *scaffold (matrices)* con células madre mesenquimales (MSC) aumentó la formación de hueso nuevo y mejoró la curación en comparación con los controles negativos en todos los estudios que utilizaron la IT.

De los factores de crecimiento utilizados en la regeneración maxilofacial en general y del hueso de la mandíbula de forma específica las proteínas morfogénicas óseas (BMP) fueron las más populares y todos los subtipos promovieron la formación significativa de hueso en comparación con los controles.

Aunque existen pocos estudios en este contexto, todos ellos sugieren un futuro prometedor para la IT, pero coinciden con que el reto fundamental se centra en desarrollar métodos y técnicas que permitan mejorar la supervivencia de las células

generadas en laboratorio a partir de cultivos celulares, así como desarrollar biomateriales plenamente biocompatibles que permitan mejorar la biointegración, para desarrollar así nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de estos pacientes.

#### 1.9.2 MATRICES EXTRACELULARES O SCAFFOLDS.

El *scaffold* (en inglés “andamio”) es una matriz tridimensional porosa que permite la adhesión, proliferación y migración celular, al igual que la diferenciación y maduración de estas células hacia un fenotipo osteoblástico en su interior (Marler et al., 1998).

Como hemos explicado anteriormente cualquier tejido se compone de una matriz extracelular combinada con uno o varios tipos celulares. Esta matriz ejerce de soporte tridimensional, definiendo una arquitectura y un medio específicos para cada tejido que permite la reserva en su interior de nutrientes, citoquinas o factores de crecimiento, siendo estos fundamentales para el proceso regenerativo (Agrawal y Ray, 2001).

Durante el proceso de regeneración, esta matriz extracelular ejerce de estructura tridimensional de soporte; para que se lleve a cabo en su interior la proliferación celular y el depósito de matriz extracelular necesarios para el desarrollo de tejido óseo, permitiendo además la vascularización de este nuevo tejido (Hutmacher, 2000).

El tejido óseo posee una estructura tridimensional definida, y las células cultivadas *in vitro* no adoptarán por sí solas esa estructura, por lo que se debe recurrir a un *scaffold* o matriz tridimensional que permita al nuevo tejido adquirir la conformación adecuada (Salgado et al., 2004; Patel y Fisher, 2008).

Idealmente, las matrices extracelulares empleadas en ITO deberían tener las siguientes características: micro y macro estructurales para permitir la regeneración, crecimiento, supervivencia y mantenimiento del fenotipo del tejido óseo (Leong et al., 2003).

Los biomateriales utilizados deben cumplir algunos requisitos básicos como; ausencia de toxicidad, ausencia de potencial carcinogénico y tolerancia a la esterilización antes de su implante *in vivo*. Siendo la BIOCOMPATIBILIDAD uno de estos requisitos básicos indispensables, para evitar provocar una respuesta inmune en el receptor (Hutmacher, 2000; Leong et al., 2003).

Además, deben contar con algunas PROPIEDADES MECÁNICAS para igualar las de los tejidos donde van a ser implantados que permita resistir durante su procesado y maduración *in vitro* y, una vez implantadas, conseguir una movilización temprana como: permeabilidad, estabilidad, elasticidad, flexibilidad y plasticidad, para poder fabricarlos de formas diferentes, ya sean, láminas, geles, o estructuras tridimensionales sólidas (Hutmacher, 2000; Al-Ruwaithi et al., 2014).

Estos biomateriales han de permitir la adhesión celular y la activación de los diferentes factores de crecimiento por lo que resulta indispensable que tengan una QUÍMICA DE SUPERFICIE ADECUADA para la unión, proliferación y diferenciación celular. En el caso de la ITO suele ser más eficiente una superficie rugosa respecto a las superficies puramente lisas.

Preferiblemente el material debe ser tridimensional y altamente poroso con una red de poros interconectados para la penetración, distribución, proliferación celular, el crecimiento de capilares (permitiendo la vascularización *in vivo*), la difusión de nutrientes y eliminación de residuos. En ITO el tamaño del poro debe oscilar entre los 200 y 900  $\mu\text{m}$ . Los demasiado pequeños se obstruyen y los demasiado grandes aportan una menor resistencia mecánica.

En cuanto a su BIODEGRADABILIDAD, las matrices utilizadas deben presentar una correcta biodegradación y sustitución total por tejido óseo neoformado. Siendo lo más

óptimo que la velocidad de degradación y la de formación del nuevo tejido óseo sea la misma (Langer y Vacanti, 1993; El-Ghannam, 2004).

Por último, tendríamos que hablar de la OSTEOINDUCCIÓN cualidad de las matrices extracelulares en la ITO, absolutamente necesaria, en particular en defectos óseos amplios, donde la osteoinducción que se produce de forma natural no es suficiente para el mantenimiento del fenotipo celular osteoblástico, y por tanto para producirse la osteogénesis en esa localización.

### 1.9.3 TIPOS DE BIOMATERIALES.

En general, estas matrices extracelulares utilizadas para la generación de tejidos mediante Ingeniería Tisular van a estar compuestas por diferentes tipos de biomateriales. La elección del material para la confección del *scaffold* es fundamental, puesto que será determinante en las propiedades del mismo. Estas matrices se pueden producir en forma de bloques sólidos, láminas, esponjas o espumas porosas e hidrogeles.

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

- Biológicos o biogénicos: incluyen matrices acelulares como: colágeno, alginato, glicosaminoglicanos y fibrina.
- Sintéticos: ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polietilenglicol y varios hidrogeles.
- Semisintéticos: son una combinación entre ambos.

Como hemos comentado con anterioridad en la presente Tesis Doctoral, se utilizará un biomaterial, diseñado y patentado previamente por este mismo Grupo de Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada (biomaterial nanoestructurado de fibrina-agarosa) altamente biocompatible, utilizado con éxito para la generación de

distintos tipos de tejidos (Alaminos et al., 2006; Carriel et al., 2012; Garzón et al., 2013; Martín-Piedra et al., 2017).

Además, con la reciente aplicación con éxito de las técnicas físico-químicas de compresión plástica, se ha logrado desarrollar matrices de fibrina que podrían ser de gran utilidad en la sustitución in vivo de tejidos sometidos a grandes cargas biomecánicas como se observan en el paladar. Algo que también nos parece interesante en el hueso de la mandíbula (Liceras-Liceras et al., 2017; Martín-Piedra et al., 2017).

#### 1.9.4 TÉCNICAS DE PROCESADO

Los hidrogeles de fibrina ofrecen un gran potencial para su utilización como *scaffolds* en IT por presentar un alto contenido en agua, una alta biocompatibilidad y unas propiedades mecánicas muy similares a las de los tejidos blandos. Su obtención y elaboración resultan técnicamente fáciles y baratas (Jockenhoevel et al., 2001).

Pero su problema principal cuando se utilizan en ITO es su escasa resistencia mecánica, además tienen un potencial de contracción significativo, y un proceso de degradación rápido (Mol et al., 2005)

En cuanto a la resistencia mecánica, puede incrementarse combinando la fibrina con otros materiales como el poliuretano, policaprolactone, polietilenglicol, fosfato b-tricálcico e HA para la obtención de *scaffolds* compuestos con mejores propiedades mecánicas (Weinand et al., 2007).

Existen diversos tipos de *scaffolds* elaborados a partir de elementos del plasma y que, al igual que la fibrina, presentan la ventaja de ser fáciles y baratos de obtener, e inmunogénicamente compatibles. Recientemente ha sido descrito un novedoso método para la obtención de un *scaffold proteico* a partir de la albúmina plasmática, unida covalentemente con un grupo aldehído y liofilizada. Esta técnica combina las ventajas de los hidrogeles clásicos, con unas favorables propiedades mecánicas, que no habían

sido descritas para estos anteriormente, que lo hacen fracamente interesantes en ITO, donde las estructuras están sometidas a grandes cargas biomecánicas (Gallego et al., 2010).

Son muy numerosas y variadas las técnicas de procesado de matrices tridimensionales descritas en la bibliografía. Algunas de ellas son la inversión de fase, el enlace de fibras, y los métodos basados en alta presión, en el fundido o en la congelación.

En la actualidad técnicas de prototipado rápido están siendo utilizadas para la fabricación de scaffolds de última generación, mediante el 3D *printing* y 3D *plotting* que generan modelos 3D gracias a información originada en una tomografía computerizada dando lugar a un *scaffold* con una macroestructura que se adapte específicamente a cada defecto y aporte además una microestructura con un buen flujo de nutrientes y una óptima vascularización (Weinand et al., 2007)

También se está investigando la posibilidad de incorporar revestimientos a los *scaffolds*, que supondrían un almacén de sustancias diversas que mejorarían la integración del implante, como por ejemplo factores de crecimiento de diferentes tipos.

En esta misma línea se han desarrollado los *scaffolds* inteligentes, con la capacidad de liberar factores bioquímicos en cantidades relativamente precisas y durante un periodo de tiempo determinado, que permitan promover una infiltración capilar temprana, mantener la actividad y el fenotipo celular deseados, e inducir la diferenciación osteoblástica de las células progenitoras presentes en la zona receptora (Haynesworth et al., 1992; Langer y Vacanti, 1993; Gundle et al., 1995).

1.9.5 CELULAS OSTEOFORMADORAS. OSTEOBLASTOS. CELULAS MADRE. CELULAS MADRE EMBRIONARIAS.CELULAS MADRE ADULTAS. CELULAS MADRE PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS.

**CELULAS OSTEOFORMADORAS. OSTEOBLASTOS**

Una vez obtenida la matriz adecuada, las células ideales para la ITO, deben de ser fáciles de obtener y expandir, deben presentar un patrón de expresión proteica similar al del tejido óseo y no deben generar respuestas inmunes. Se han utilizado tanto células autólogas como heterólogas, con distintos grados de maduración. Los osteoblastos maduros y activos suponen teóricamente la mejor opción, y si son obtenidos del propio paciente se acaba con reacción inmunitaria. El problema es que su obtención tiene connotaciones negativas, su disponibilidad es escasa y su capacidad de expansión baja.

Cuando estas células provienen de un trasplante xenogénico, se resuelve el problema de la biodisponibilidad, pero aparecen las respuestas inmunológicas y la posibilidad de transmisión de enfermedades.

**CELULAS MADRE “STEM CELLS”**

El avance científico y médico en el estudio de células madre se ha revolucionado en los últimos años, y se encuentra en la actualidad en investigación para infinidad de patologías, estos tratamientos con células madre podría ofrecer nuevos campos de investigación para médicos y científicos y nuevas esperanzas de vida para los pacientes (Murcia-ordo, 2017).

Son células indiferenciadas con gran capacidad de división (capacidad de autorenovación) y diferenciación en distintas líneas celulares más especializadas bajo las condiciones óptimas.

Estas células pueden clasificarse según su potencialidad en; células madre totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes,

Una característica que permite otra clasificación de las células madre es su lugar de origen; clasificándose en células madre embrionarias, adultas y pluripotenciales inducidas. Esta clasificación es la que vamos a desarrollar a continuación.

**Células madre embrionarias(CME):** Se encuentran en las primeras fases del desarrollo embrionario , derivan del blastocisto embrionario y son células pluripotenciales, es decir, capaces de producir cualquier clase de célula del cuerpo; pudiendo transformarse en cualquier tipo funcional de los 3 linajes embrionarios (endodermo, mesodermo y ectodermo) (Polak y Bishop, 2006).

Presentan una capacidad ilimitada de autorrenovación in vitro, característica que garantiza por tanto una disponibilidad abundante de células óseas en este caso.

Hoy en día existen algunos aspectos conflictivos por lo que respecta a su utilización: su potencial carcinogénico (pueden dar lugar a teratomas y teratocarcinomas), su problema inmunogénico y el conflicto ético que supone el manejo de embriones humanos. Las CME pueden ser aisladas de la masa celular interna del embrión a los 4-14 días de edad o en las gónadas fetales. También de embriones sobrantes tras la fertilización in vitro, de teratomas o carcinomas embrionarios, fetos abortados de entre 5-9 semanas de gestación (Becerra et al., 2001).

**Células madre adultas:** Esta población celular se encuentra en los tejidos adultos y en el cordón umbilical del cual se pueden obtener sin causar daño alguno al embrión. Estas células dan lugar a células adultas del tejido en el que se encuentren. Durante el desarrollo embrionario se forman unas células multipotentes de origen mesodérmico que darán lugar a los tejidos mesenquimatosos. Algunas de estas células quedan como tales en el periodo postnatal, y son las encargadas de la reparación de los diferentes

tejidos en el individuo adulto. Dichas células se conocen como células madre adultas, mesenquimales o multipotentes (*MSC: Mesenchymal Stem Cell*), y fueron identificadas inicialmente en la médula ósea, aunque a día de hoy se han conseguido aislar en muchos tejidos, entre ellos el tejido graso y muscular, tendones, pulpa dental, ligamento periodontal, sangre del cordón umbilical, placenta, periostio, hígado, tejido cartilaginoso y bazo (Arthur et al., 2009).

Cada grupo de células madre conserva característicamente la capacidad de auto-renovación.

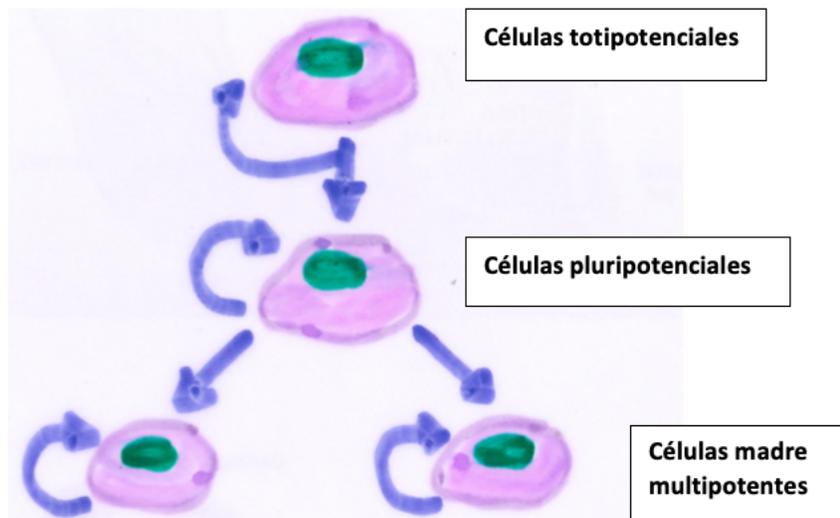


Imagen 20: Dibujo realizado por la autora: Generación de diferentes líneas celulares a partir de células totipotenciales.

Existen características fundamentales que definen a estas MSC (Sotiropoulou et al., 2006):

- Gran potencial proliferativo.
- Capacidad para generar células formadoras de la unidad de fibroblastos (CFU-F).
- Capacidad para diferenciarse hacia hueso, grasa y cartílago.
- Inmunotolerancia a las MSCs alogénicas.

- Propiedades inmunomoduladoras.

Las diferentes MSCs, presentan distinto potencial proliferativo, así como diferente capacidad de diferenciación según su tejido de origen. Los cinco tipos celulares que han demostrado capacidad de formar hueso nuevo in vivo, es decir, potencial osteogénico se encuentran las derivadas de:

- La médula ósea (BMSC, del inglés *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell*).
- Tejido adiposo (ASC, del inglés *Adipose derived Stem Cell*).
- Pulpa dental (DPSC, del inglés *Dental Pulp Stem Cell*).
- Ligamento periodontal (PDLSC, del inglés *Periodontal Ligament Stem Cell*).
- Dientes caducos humanos exfoliados (SHED, del inglés *Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth*) [140].

Desde un punto de vista general, las MSCs son las que se están utilizando actualmente en la mayoría de los trabajos experimentales, ya que presentan ventajas con respecto a las embrionarias para su uso en ITO. Las células madre derivadas del tejido adiposo tienen como principal ventaja la facilidad de su obtención, con mínima morbilidad en la zona donante.

**Células madre pluripotenciales inducidas:** (iPSC, del inglés *induced Pluripotent Stem Cell*). Recientemente se ha logrado identificar un nuevo tipo, las células madre pluripotenciales inducidas (iPSC), descubiertas por John B. Gurdon y Shinya Yamanaka, ganadores del premio nobel de fisiología y medicina. Estas células son obtenidas mediante la alteración del patrón de expresión génica de células somáticas adultas y han demostrado tener la capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos maduros cuando son sometidas a un procesamiento adecuado (Gurdon et al., 2003; Illich et al., 2011; Takahashi y Yamanaka, 2013; Liceras-Liceras et al., 2017; Oliver et al., 2020).

A la capacidad de transformación, es decir, de diferenciarse a células de otro linaje sin que tengan que revertir a célula madre o progenitora se le ha denominado transdiferenciación celular (Su et al., 2013).

Este fenómeno en las células puede deberse a:

1. Una mutación en la secuencia de nucleótidos del ADN.
2. Modificaciones epigenéticas, cambios a nivel del genoma debidos a modificaciones en el patrón de expresión génica por procesos de metilación o acetilación del ADN, modificación de histonas u otros procesos epigenéticos.
3. Factores ambientales que intervienen en los cambios que se producen en la expresión génica.

#### 1.9.6 FACTORES DE CRECIMIENTO

Como hemos comentado anteriormente, los FC son aquellas moléculas (proteínas) que estimulan o inhiben la división celular, su diferenciación, migración y la expresión génica de forma global. Dichas proteínas son secretadas de forma endógena por las células o bien, son el resultado de señales paracrinas con células vecinas. En las técnicas de ITO en las que se injertan matrices sembradas de células osteogénicas, estos factores son producidos tanto por las células del huésped como por las del injerto y a su vez van a actuar sobre ambos tejidos.

Existen factores de crecimiento producidos industrialmente para luego añadirlos a dichas matrices o introducirlos directamente sobre los defectos, consiguiendo potenciar el proceso de regeneración ósea; además, como hemos explicado anteriormente, muchas veces dichos FC tiene propiedades que promueven la angiogénesis de la zona, incrementando el proceso de regeneración ósea.

Los factores de crecimiento más usados en Ingeniería Tisular son, fundamentalmente, la proteína morfogenética ósea (BMP), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF ó FGF-2), el factor de crecimiento vascular epitelial y el factor de crecimiento transformante-b (TGF-b) (Jiang et al., 2010).

Existen un gran número de BMPs, los tipos 2, 4, 6 y 7 son considerados los más osteoinductivos, y su función principal es la de reclutar MSCs en la zona en la que se producirá la regeneración ósea e inducir su diferenciación hacia la estirpe osteogénicas. El mecanismo de actuación de estos factores de crecimiento no se conoce con exactitud, pero sí sabemos que juegan un papel importante en la expresión de marcadores osteogénicos como la fosfatasa alcalina o la osteocalcina (Gallea et al., 2001; Lind y Bünger, 2001; Jadowiec et al., 2003; Orive et al., 2003).

En bibliografía actual al respecto se han identificado algunos de los genes responsables de la síntesis de las BMPs, y se han obtenido mediante técnicas de biología molecular las BMPs recombinantes humanas de los tipos 2 (rhBMP-2) y 7 (rhBMP-7). Estas BMPs recombinantes se han utilizado en animales de experimentación, con buenos resultados en cuanto a la reparación ósea; en fracturas de fémur de rata, reparación de defectos óseos maxilares en monos e incluso han sido usadas para la reconstrucción de defectos mandibulares en humanos, sin la necesidad de utilizar injertos óseos concomitantes (Boyne, 1996; Einhorn, 1998; Herford y Boyne, 2008).

#### 1.9.7 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO(ADSCs)

Una de las fuentes de células madre adultas más importantes para la generación de tejidos artificiales mediante ingeniería tisular es el tejido adiposo humano. Son células multipotenciales de tipo mesenquimal, con la capacidad de diferenciarse hacia otros tipos celulares del mismo origen mesenquimático; como el hueso, cartílago, la grasa y el músculo. Las células madre procedentes de tejido adiposo se han convertido

en los últimos 5 años en una de las principales herramientas en el campo de la terapia celular (De Ugarte et al., 2003; Castro, 2013).

El tejido adiposo humano subcutáneo rico en células madre mesenquimales del tejido adiposo (ADSCs), es uno de los tejidos más abundantes, representa alrededor del 15-20% del peso corporal del hombre y del 20-25% del peso corporal en mujeres.

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

- **El tejido adiposo unilocular o “grasa amarilla”**, cuyas células contienen una sola vacuola de lípido almacenado. Es la variedad más común. (Figura 21).
- **El tejido adiposo multilocular o “grasa parda”** (por asociar numerosos capilares sanguíneos) es abundante en embriones humanos y recién nacidos, pero su concentración en individuos adultos es restringida. Son células poligonales y más pequeñas, cuyo citoplasma contiene numerosas vacuolas (Figura 21).

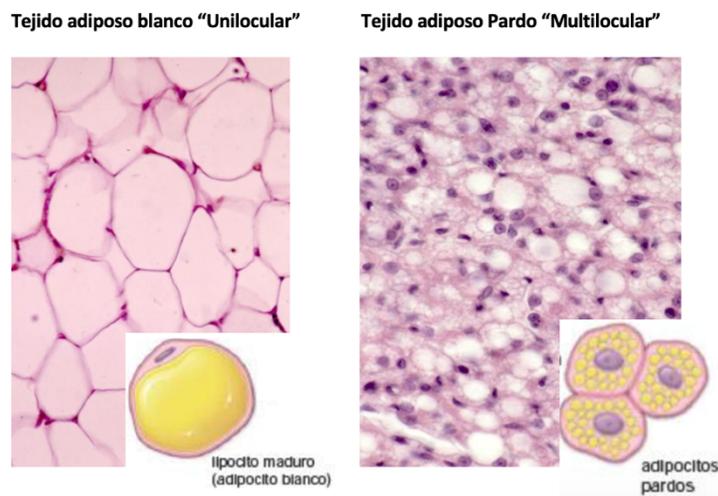


Imagen 21: Esquema de la autora; diferenciación de tipos de tejido adiposo.

El proceso para la formación de los dos tipos de tejido adiposo es diferente, pero en ambos casos, se debe a la diferenciación de células mesenquimales primitivas. Esto ocurre a partir del 5 mes de vida intrauterina.

Las células adiposas totalmente desarrolladas no sufren más mitosis y tras el nacimiento sólo se forman nuevas células adiposas a partir de células mesenquimales indiferenciadas: lo que se conoce como crecimiento hiperplásico.

También puede aumentar la cantidad de tejido, por el aumento del tamaño de los adipocitos como consecuencia de acumulación intracelular de lípidos, lo que se conoce como crecimiento hipertrófico

### **OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE DEL TEJIDO ADIPOSO (ASC)**

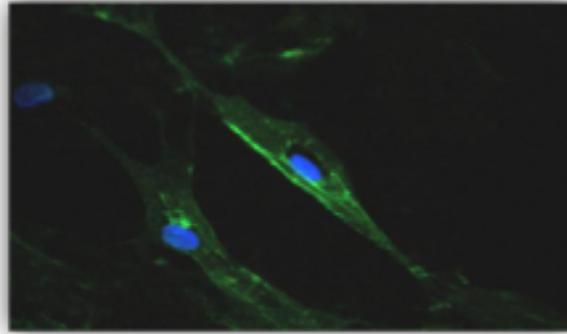
Una vez obtenido el tejido adiposo subcutáneo, se somete a un proceso de lavado, digestión enzimática y centrifugación, que proporciona un pellet o sedimento que contiene la fracción vascular estromal (*Stromal Vascular Fraction, SVF*). La SVF contiene los diferentes componentes del tejido adiposo excepto la mayoría del volumen de adipocitos y la parte oleosa que se descartan en el sobrenadante. (Castro, 2013)

Los tipos celulares que se recogen son: adipocitos residuales, macrófagos, células endoteliales, pericitos, células del músculo liso, fibroblastos, preadipocitos y finalmente las (ASC) (Zimmerlin et al., 2010).

Para la obtención de las ASC la SVF se dispone en un cultivo en medio de estándar y suero bovino fetal (10%), y se van seleccionando en sucesivos lavados las células adherentes al plástico. A medida que se realizan subcultivos, la población de ASC se va purificando de los otros tipos celulares presentes en la SVF (Zimmerlin et al., 2010).

Para diferenciar a las ADSCs de otros tipos celulares presentes en el tejido adiposo, existen diversos estudios que muestran su expresión fenotípica característica con su

variedad específica de marcadores de superficie. La ISCT (*Inter national Society of Cell Therapy*) propuso en 2006 los siguientes criterios para caracterizar de forma consensuada a las células madre mesenquimales (Dominici et al., 2006):



*Imagen 21: Imagen de Microscopía electrónica donde se observa la expresión fenotípica de ADSCs en cultivos por la expresión del marcador CD73. (Nieto-Aguilar et al., 2011)*

Generación de un sustituto óseo humano mediante ingeniería tisular para el tratamiento de defectos mandibulares.

# OBJETIVOS

## 2 OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es generar y evaluar nuevos sustitutos de hueso humano para la reparación del hueso mandibular en un modelo crítico de lesión mandibular.

Para ello se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar un modelo de hueso humano artificial nanoestructurado utilizando biomateriales de fibrina-agarosa y células madre mesenquimales del tejido adiposo (MSC).
- Determinar las características histológicas del modelo de hueso humano artificial nanoestructurado.
- Analizar la biocompatibilidad in vivo del modelo de hueso humano artificial nanoestructurado utilizando un modelo animal de defecto mandibular crítico.
- Analizar la utilidad del hueso humano artificial nanoestructurado para inducir la regeneración mandibular en un modelo animal de defecto mandibular crítico. Analizar las características histológicas y radiológicas del hueso regenerado mediante la utilización del modelo de hueso humano artificial nanoestructurado en un modelo animal de defecto mandibular crítico.

# MATERIALES Y MÉTODOS

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL TEJIDO ADIPOSO HUMANO.**

Para generación de cultivos celulares de células madre mesenquimales del tejido adiposo humano (ADSC), en primer lugar, se obtuvieron pequeñas biopsias de tejido adiposo de pacientes pediátricos sometidos a cirugía electiva bajo anestesia general por diferentes procedimientos en el Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. En todos los casos, se obtuvo una pequeña muestra de tejido sobrante durante el procedimiento quirúrgico del paciente. Todas las muestras de tejido adiposo extraídas fueron sumergidas en un medio de transporte a 4°C y enviadas al laboratorio antes de 24h, para su procesamiento. El medio de transporte estaba constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) obtenido comercialmente (Merck, Darmstadt, Alemania, ref. D6429) al que se añadieron antibióticos y antimicóticos (Merck ref. A5955) hasta una concentración final de 500 unidades de penicilina, 500 µg de estreptomina y 1,25 µg de anfotericina B por ml, para evitar la contaminación del cultivo.

Una vez recibidos en el Laboratorio de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada, los tejidos humanos se procesaron siguiendo protocolos previamente elaborados por el grupo para el establecimiento de cultivos celulares primarios (Nieto-Aguilar et al., 2011; Carriel et al., 2013) que se resumen en la Figura 22. En primer lugar, las muestras de tejido adiposo se lavaron dos veces en una solución estéril de tampón fosfato (PBS) (Merck ref. D8662) dentro de una cabina de flujo laminar. Tras ello, se procedió a la fragmentación mecánica de los tejidos para facilitar su futuro procesamiento. Posteriormente, estas muestras fueron sometidas a digestión enzimática utilizando una solución de colagenasa tipo I de *Clostridium*

*histolyticum* al 0,3% (Gibco BRL Life Technologies, Waltham, MA, EE.UU.) durante 8 horas a 37°C con leve agitación. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a recoger las células liberadas del tejido mediante centrifugación del producto de la digestión durante 10 minutos a 1000 rpm. Las células así recogidas se lavaron en PBS y se cultivaron en frascos de cultivo celular utilizando medio de cultivo MF, el cual estaba compuesto por DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Merck ref. F7524) y antibióticos y antimicóticos (Merck ref. A5955) hasta una concentración final de 100 unidades de penicilina, 100 µg de estreptomicina y 0,25 µg de anfotericina B por ml (Nieto-Aguilar et al., 2011; Blanco-Elices et al., 2021). Estos cultivos celulares se mantuvieron en un incubador celular a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>, siguiendo protocolos estándar de cultivo celular, procediéndose a subcultivar las células cuando éstas alcanzaron subconfluencia.

Todos los donantes o sus representantes legales aceptaron su participación en el estudio y firmaron el correspondiente consentimiento informado. Asimismo, el estudio fue aprobado por el Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía, con número de aprobación PEIBA0116-N-19, de 29 de mayo de 2019. En todo momento, se siguió la normativa europea referente a la investigación biomédica, incluyendo las directivas de la Declaración de Helsinki.

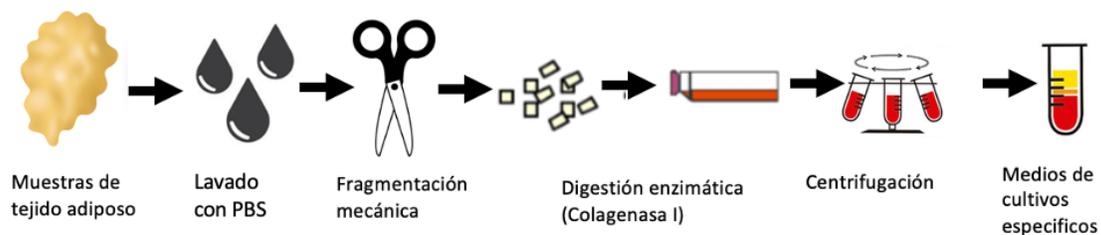


Figura 22. Procedimiento utilizado para el establecimiento de cultivos celulares de ADSC a partir de biopsias de tejido adiposo humano.

### **3.2 GENERACIÓN DE UN MODELO DE HUESO HUMANO ARTIFICIAL NANOESTRUCTURADO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.**

En la presente Tesis Doctoral, se generaron dos modelos de sustitutos tisulares mediante ingeniería tisular: un modelo acelular (constructo acelular), compuesto exclusivamente por biomateriales, y un modelo celularizado (sustituto óseo celular o hueso artificial), compuesto por células y biomateriales, siguiendo protocolos previamente establecidos por el grupo de investigación (Scionti et al., 2014; Licerias-Licerias et al., 2017; Blanco-Elices et al., 2021).

Para generar 1 ml de constructo, se mezclaron 760  $\mu$ l de plasma humano procedente de donantes sanos de sangre provista por el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía con 75  $\mu$ l de DMEM, 15  $\mu$ l de ácido tranexámico (como agente antifibrinolítico) (Amchafibrin 5 mg/mL, MEDA Pharma SL, Madrid) y 50  $\mu$ l de una solución de agarosa tipo VII al 2% en PBS (Merck) calentada hasta ebullición y atemperada. Tras mezclar cuidadosamente, se añadieron 100  $\mu$ l de una solución de cloruro cálcico al 1% para inducir la reacción de coagulación del plasma y la mezcla se alicuotó en placas de 6 pocillos (5 ml por pocillo). En el caso del hueso artificial celularizado, se añadieron a la mezcla 50.000 células ADSC mantenidas en cultivo, justo antes de añadir la agarosa y el cloruro cálcico, procediéndose a inducir la reacción de polimerización después de añadir las células. Tanto en el constructo celular como en el acelular, las placas de 6 pocillos que contenían 5 ml de la mezcla celular o acelular se incubaron durante 24h en un incubador celular a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> para favorecer la gelificación completa del biomaterial.

En el caso de los constructos que contenían células, y una vez gelificados los hidrogeles, se indujo la diferenciación osteogénica de las ADSC inmersas en el biomaterial, aplicando un medio osteogénico previamente optimizado por el grupo de

investigación (Nieto-Aguilar et al., 2011). Este medio inductor estaba compuesto por medio MF suplementado con dexametasona, a una concentración de 100 nM, beta-glicerol-fosfato, a concentración 10 mM, y ácido ascórbico, a una concentración de 50 mM. Este medio se renovó cada 3 días, manteniéndose los constructos celulares sumergidos en medio osteogénico hasta un total de 21 días.

Transcurrido ese tiempo, tanto los sustitutos celulares como los acelulares se extrajeron cuidadosamente de los pocillos de cultivo y se sometieron a compresión plástica (nanoestructuración) para mejorar sus propiedades biomecánicas y obtener sustitutos más consistentes y resistentes, tal como se describió previamente (Ionescu et al., 2010; De La Cruz Cardona et al., 2011; Scionti et al., 2014). Para ello, se procedió del siguiente modo (Figura 23):

1. Colocación de varias láminas de papel absorbente estéril sobre una superficie sólida (placa de vidrio).
2. Colocación sobre el papel absorbente de un filtro poroso de policarbonato de 0,4  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Merck-Millipore).
3. Colocación de la muestra a nanoestructurar sobre el filtro poroso.
4. Colocación de un nuevo filtro poroso sobre el biomaterial.
5. Colocación de varias láminas de papel absorbente estéril sobre el filtro poroso superior.
6. Colocación de una superficie sólida (placa de vidrio) sobre el papel absorbente superior.
7. Aplicación de 500 g de peso durante 3 min para inducir la reacción de entrecruzamiento nanomolecular entre las fibras de fibrina y la agarosa.
8. Retirada del papel y de los filtros porosos.
9. Obtención del tejido nanoestructurado y rehidratación parcial en medio de cultivo estéril.

Generación de un sustituto óseo humano mediante ingeniería tisular para el tratamiento de defectos mandibulares.



Figura 23. Ilustración que muestra los diferentes componentes utilizados para inducir la nanoestructuración de los sustitutos celulares y acelulares generados en la presente Tesis Doctoral.

Tras ello, los biomateriales nanoestructurados fueron enrollados sobre sí mismos para formar un cilindro sólido compuesto por láminas concéntricas de dichos materiales, siguiendo protocolos de biofabricación previamente diseñados por el grupo (Carriel et al., 2017; Chato-Astrain et al., 2018). (Figura 24)

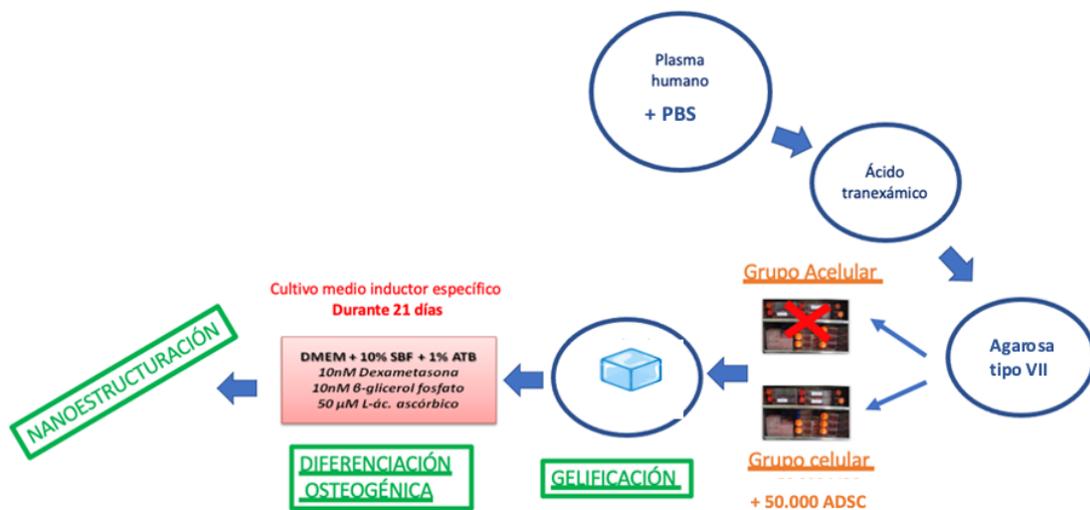


Figura 24. Ilustración esquemática del protocolo utilizado para la generación de sustitutos acelulares y de hueso artificial celularizado obtenido mediante ingeniería tisular.

### **3.3 ANÁLISIS BIOMECÁNICO DEL HUESO HUMANO ARTIFICIAL NANOESTRUCTURADO GENERADO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.**

Las propiedades biomecánicas de los tejidos bioartificiales de fibrinaagarosa generados en el presente trabajo se evaluaron utilizando un instrumento de análisis biomecánico Instron modelo 5943 (Norwood, MA, EE.UU.) y el programa de análisis biomecánico Bluehill 3. Los tejidos bioartificiales generados en esta Tesis Doctoral y se colocaron sobre las mordazas de sujeción del dispositivo, dejando una distancia de 1 cm libre entre ambos extremos. Tras ello, se programó el instrumento de análisis biomecánico para generar una tracción continua de a una velocidad de deformación de 5 mm/min, hasta lograr la ruptura total de la muestra.

Se analizó un total de 5 muestras. En cada una de ellas, se analizaron los siguientes parámetros, determinados automáticamente por el software:

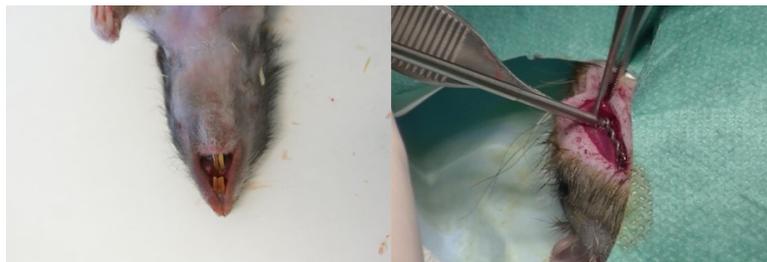
- Módulo de Young.
- Esfuerzo de tracción a la rotura
- Carga a la rotura.
- Extensión de deformación a la rotura.

### **3.4 ANÁLISIS *IN VIVO* EN UN MODELO DE DEFECTO CRÍTICO MANDIBULAR.**

Para evaluar la biocompatibilidad y funcionalidad *in vivo* de los sustitutos bioartificiales generados mediante ingeniería tisular en la presente Tesis Doctoral, estos sustitutos se implantaron a nivel del hueso mandibular en animales de laboratorio sometidos a lesión crítica de dicha estructura.

Para ello, se utilizaron ratas atímicas desnudas inmunodeficientes Crl:NIHFoxn1<sup>tmu</sup>. Estos animales presentan un defecto en el desarrollo del timo y, por tanto, poseen un

déficit en la función de los linfocitos T, encargados, entre otras cosas, del rechazo inmunológico de células y tejidos alogénicos y xenogénicos implantados en dichos animales. Tras preparar el campo quirúrgico estéril, los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina y acepromacina (Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Alemania). Posteriormente, se expuso quirúrgicamente la rama mandibular derecha, separándose los músculos que se encontraban adheridos a ella, y se procedió a extraer un fragmento de hueso mandibular de 1 cm de longitud en dicha rama de la mandíbula utilizando una microsierra eléctrica de mano de uso en odontología. Este defecto se considera crítico de gran tamaño, por lo que el hueso no puede regenerarse por sí mismo. Para estabilizar el hueso mandibular y permitir la movilidad y funcionalidad normal de la mandíbula, a todos los animales intervenidos se les implantó posteriormente una microplaca de titanio, la cual se fijó con dos tornillos a cada lado del defecto (Figura 25). En los grupos de estudio, el defecto mandibular se rellenó con un constructo generado mediante ingeniería tisular, mientras que este espacio quedó sin rellenar en el grupo de control negativo. En todos los casos, se cerró la herida por planos, reparándose los tejidos blandos y cerrándose la incisión cutánea con material de sutura quirúrgica. El lado izquierdo (no intervenido) sirvió como control en todos los casos. El procedimiento se muestra esquemáticamente en la Figura 26.



*Figura 25. Animal de laboratorio utilizado para los estudios in vivo. A la izquierda, se muestra una imagen del animal atímico antes de la intervención. A la derecha, imagen intraquirúrgica en el momento de la colocación de una microplaca de titanio y su fijación a la mandíbula utilizando un tornillo quirúrgico.*

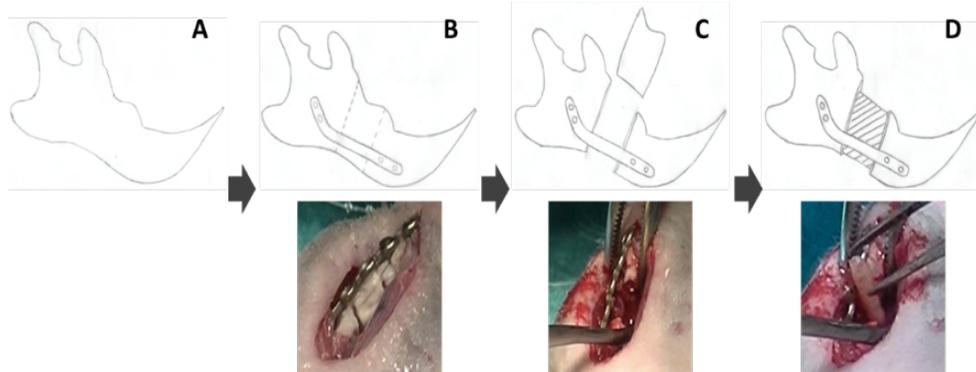


Figura 26. Representación del procedimiento utilizado para generar un modelo de lesión mandibular crítica de gran tamaño en animales de laboratorio. A: exposición quirúrgica de la rama mandibular; B: sección del hueso y fijación de una microplaca de titanio; C: escisión del fragmento óseo; D: implante del sustituto generado mediante ingeniería tisular a nivel del defecto óseo.

Los grupos de animales estudiados en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Grupo Control Positivo (P-CTR). Este grupo corresponde a 2 animales que no fueron intervenidos y que se dejaron evolucionar de forma natural.
2. Grupo Control Negativo (N-CTR). En este grupo se incluyeron 4 animales en los que se generó el defecto óseo descrito más arriba, no implantándose ningún sustituto a nivel del defecto.
3. Grupo Acelular (ACEL). En este grupo se incluyeron 4 animales en los que se generó el defecto óseo descrito más arriba, implantándose posteriormente un sustituto acelular de fibrina-agarosa nanoestructurada a nivel del defecto.
4. Grupo Hueso Humano Artificial Celularizado (HHA). En este caso, se utilizaron 8 animales a los que se generó el defecto óseo descrito más arriba, implantándose posteriormente un sustituto de hueso humano generado por ingeniería tisular que contenía células diferenciadas hacia la estirpe osteogénica a nivel del defecto.

Tras la cirugía, todos los animales recibieron pauta analgésica con metamizol magnésico durante 7 días, y los animales tenían acceso libre al alimento y al agua de bebida. Tras 4 meses de seguimiento, se procedió al sacrificio de todos los animales

mediante inyección intracardiaca de un agente de eutanasia bajo anestesia general profunda.

Todos los estudios con animales de experimentación se llevaron a cabo en la Unidad de Experimentación Animal del Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, bajo supervisión veterinaria. Estos estudios fueron aprobados por el comité de ética de la investigación animal de la Junta de Andalucía (ref. 08/07/2019/122).

### **3.5 ANÁLISIS RADIOLÓGICOS.**

Una vez sacrificados, todos los animales fueron analizados utilizando un sistema de radiografía panorámica con escáner dental 3D Combi 500 (PointNix, Seúl, Corea del Sur) (Liceras-Liceras et al., 2017). Para ello, se colocó la cabeza de cada animal en un soporte de poliestireno, escaneándose a continuación en 360º a alta resolución. Tras ello, se analizaron las diferentes imágenes para obtener las siguientes imágenes y los siguientes parámetros:

1. Imágenes de reconstrucción tridimensional (3D) del esqueleto craneofacial. A partir de estas imágenes, se realizaron análisis morfológicos para valorar los siguientes parámetros cualitativos:

- Estructura general y la simetría del cráneo, determinándose la morfología de los dientes, la mordida y la oclusión dental y la morfología y simetría del esqueleto craneofacial.
- Análisis cualitativos de la zona del defecto crítico mandibular.

2. Imágenes tomográficas obtenidas a nivel del defecto crítico mandibular.

Estas imágenes se utilizaron para determinar parámetros cuantitativos relacionados con el defecto crítico mandibular. En cada animal, se tomaron tres medidas diferentes,

calculándose el valor medio de los tres. Estos datos fueron obtenidos por tres especialistas independientes:

- Tamaño del defecto mandibular, expresado en milímetros.
- Radiodensidad del tejido encontrado en el interior del defecto, determinada en Unidades Hounsfield (U.H.).

#### 6. Análisis histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos.

Para el análisis histológico de las muestras de hueso artificial generadas por ingeniería tisular (sustitutos celularizados), se fijaron fragmentos de hueso artificial en formaldehído al 4% tamponado (Panreac Química S.L.U., Barcelona) durante 24h a temperatura ambiente. En el caso de los tejidos implantados *in vivo*, las mandíbulas de cada animal se diseccionaron quirúrgicamente y se fijaron igualmente en formaldehído al 4% tamponado, incluyendo el hueso y los tejidos blandos adheridos a éste. Tras ello, se extrajeron los tornillos quirúrgicos junto a la microplaca en los grupos en los que se habían utilizado estos fijadores. Los tejidos correspondientes a los animales de experimentación fueron posteriormente descalcificados mediante inmersión en reactivo de Anna Morse, compuesto por un 50% de ácido fórmico y un 20% de citrato sódico (ambos, de Panreac Química S.L.U.) durante alrededor de una semana. Tras ello, los tejidos descalcificados se cortaron con una cuchilla a nivel del sitio del defecto óseo, obteniéndose fotografías macroscópicas a este nivel para evaluar macroscópicamente la zona del implante, como parte del análisis de biocompatibilidad de los sustitutos generados mediante ingeniería tisular.

A continuación, los tejidos fijados y, en su caso, descalcificados, se incluyeron en parafina siguiendo protocolos estándar de laboratorio histológico. De forma breve, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70, 96 y 100%) (Panreac Química

S.L.U.), de aclararon en xileno y se incluyeron en parafina a 60°C utilizando un equipo de procesamiento automático de muestras histológicas Shandon Citadel 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Tras ello, se obtuvieron secciones histológicas de un grosor de 4µm utilizando un microtomo, las cuales se desparafinizaron en xileno y se rehidrataron utilizando concentraciones crecientes de etanol (100, 96 y 70%) y agua destilada.

### **3.6 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.**

Para los estudios histológicos, las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina, siguiendo protocolos estándar de tinción histológica. Para ello, las muestras rehidratadas se sumergieron en una solución comercial de hematoxilina (Panreac Química S.L.U.), se lavaron en agua corriente y se tiñeron en eosina alcohólica (Panreac Química S.L.U.), procediéndose posteriormente a su deshidratación en concentraciones crecientes de etanol, su aclarado en xileno y su montaje con cubreobjetos utilizando bálsamo de Canadá (Panreac Química S.L.U.). Una vez seco el bálsamo, se escanearon las preparaciones en un escáner de muestras histológicas Pannoramic Flash Desk DW (3D Histech, Budapest, Hungría), obteniéndose imágenes de bajo aumento (para mostrar ambas ramas de la mandíbula) y de alto aumento de la zona del implante.

En los estudios *in vivo*, estas imágenes se utilizaron para determinar la morfología global del lado intervenido de la mandíbula y del lado control, en cada uno de los grupos, así como para evaluar la biocompatibilidad del sustituto implantado a nivel del defecto, en los grupos ACEL y HHA. En ambos grupos, las muestras se analizaron histológicamente para determinar signos de rechazo, necrosis, hemorragia u otros signos microscópicos relacionados con biocompatibilidad del sustituto implantado *in vivo*.

### 3.7 ANÁLISIS HISTOQUÍMICOS.

Para evaluar la presencia de determinados componentes de la matriz extracelular (MEC) en el sitio del defecto y en el tejido nativo, las muestras se sometieron a los siguientes métodos histoquímicos, siguiendo métodos y protocolos previamente descritos (Alfonso-Rodríguez et al., 2014; Vela-Romera et al., 2019; Sánchez-Porras et al., 2021):

- Para la identificación de depósitos de calcio e indicios de mineralización ósea, se aplicó la técnica de rojo alizarina. Tras rehidratar, las muestras se sumergieron en una solución al 2% de rojo alizarina S (pH 4,2) durante 3 minutos, lavándose a continuación con abundante agua para eliminar el exceso de colorante.

- Para teñir específicamente las fibras de colágeno, se utilizó el método histoquímico del rojo picrosirius. Para ello, las muestras se incubaron durante 30 minutos en una solución de rojo sirio F3B (Panreac Quimica S.L.U.), se lavaron en agua destilada y se contratiñeron brevemente con hematoxilina de Harris, lavándose en abundante agua a continuación.

- Para identificar proteoglicanos, se utilizó la técnica del azul alcían. En este caso, las muestras se incubaron durante 30 minutos en una solución comercial de azul alcían (Panreac Quimica S.L.U.), se lavaron en agua y se contratiñeron brevemente con rojo nuclear (*nuclear fast red*) durante 1 minuto, lavándose a continuación.

- Para la identificación de componentes específicos del cartílago y del tejido osteoide, se utilizó el método del azul de toluidina. Para ello, las muestras se sumergieron en una solución de azul de toluidina al 0,2% en tampón acetato-acético (pH 4,2) durante 5 minutos, lavándose a continuación en tampón acetato-acético. Tras ello, se incubaron las preparaciones en una solución acuosa de

molibdato de amonio al 4% durante 5 minutos, lavándose posteriormente con abundante agua.

Una vez realizados estos procedimientos, las muestras se deshidrataron, se aclararon, se cubrieron con cubreobjetos y se analizaron tal como se describe para el análisis histológico.

### **3.8 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS.**

La identificación del marcador óseo osteocalcina y del componente de la MEC versicán se realizó aplicando técnicas inmunohistoquímicas. Para ello, las muestras rehidratadas se sometieron a un proceso de recuperación antigénica utilizando tampón citrato (0,01M) a pH 6 durante 5 minutos a una temperatura de 98°C. Tras lavar, se eliminaron las peroxidasa endógenas utilizando peróxido de hidrógeno al 3%, se volvieron a lavar y se aplicó una solución de prehibridación (todo ello, de Panreac Química S.L.U.). Tras ello, se incubaron las secciones a 37°C en una solución de proteinasa K (Agilent Dako, Santa Clara, CA, EE.UU.) (para osteocalcina) o de condroitinasa ABC de *Proteus vulgaris* (0,2 U/ml, Merck Life Science) (para versicán). A continuación, las muestras se incubaron durante 12 h a 4°C en una solución que contenía el anticuerpo primario anti-osteocalcina (Abcam ref. 13420, Cambridge, Reino Unido) a una dilución de 1:200 o el anticuerpo primario anti-versicán (Abcam ref. 19345) a una dilución de 1:100. Tras lavar el exceso de anticuerpo primario, las muestras se incubaron durante 30 minutos en una solución de anticuerpo secundario anti-conejo, lavándose a continuación. Finalmente, se utilizó una solución de 3,3'-diaminobencidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) para revelar la señal positiva, y las muestras se contratiñeron brevemente con hematoxilina de Mayer. Una vez realizados estos procedimientos, las muestras se deshidrataron, se aclararon, se cubrieron con cubreobjetos y se analizaron tal como se describe para el análisis histológico.

### **3.9 CUANTIFICACIÓN DE LA SEÑAL HISTOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Una vez realizados los estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos, se procedió a cuantificar la señal positiva obtenida para cada uno de los métodos de análisis en cada uno de los animales de los estudios *in vivo*. Con este fin, se utilizó el programa de análisis de imágenes ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.), tal como se hizo en trabajos previos. Tras tomar imágenes histológicas de cada una de las muestras y para cada tipo de tinción, se procedió a señalar 10 puntos al azar en la zona de interés a medir en cada caso, y se pidió al programa que determinara la intensidad de señal de forma automática, tras seleccionar el canal de color correspondiente a la señal positiva. En los casos en los que se encontraron áreas de osificación o áreas en las que se había formado tejido cartilaginoso, se procedió, además, al análisis específico de dichas áreas.

### **3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.**

En primer lugar, cada variable se analizó para determinar si su distribución se adaptaba a una curva normal utilizando la prueba estadística de ShapiroWilk. Los resultados mostraron que la mayoría de las variables no seguían este tipo de distribución, por lo cual se utilizaron, a partir de ahora, pruebas no paramétricas para el análisis estadístico de los resultados.

Para los análisis morfológicos y de simetría del cráneo de los animales incluidos en los estudios *in vivo*, los porcentajes de individuos que presentaron alteraciones en cada grupo fueron comparados utilizando el test exacto de Fisher. Para comparar los resultados de los estudios cuantitativos de la zona del defecto (tamaño y radiodensidad del defecto óseo una vez finalizado el periodo de seguimiento), se utilizó la prueba estadística de Mann-Whitney. Esta misma prueba se aplicó, asimismo, para las

comparaciones realizadas entre los diferentes grupos de animales para las variables relacionadas con parámetros histoquímicos e inmunohistoquímicos.

Todas las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando el programa RealStatistics para Excel (Dr. Charles Zaiontz, Purdue University, West Lafayette, IN, EE.UU), y los valores de significación  $p$  inferiores a 0,05 se consideraron como estadísticamente significativos en los análisis de doble cola.

Generación de un sustituto óseo humano mediante ingeniería tisular para el tratamiento de defectos mandibulares.

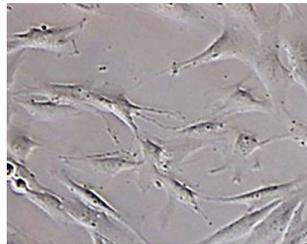
# RESULTADOS

## 4 RESULTADOS

### 4.1 GENERACIÓN DE UN MODELO DE HUESO HUMANO ARTIFICIAL NANOESTRUCTURADO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.

La aplicación de los métodos descritos en el apartado anterior permitió generar sustitutos de hueso humano mediante ingeniería tisular.

En primer lugar, los cultivos celulares de células madre mesenquimales del tejido adiposo (ADSC) establecidos a partir de biopsias del tejido graso mostraron células de morfología elongada, fusiforme o estrellada, que presentaban abundantes prolongaciones celulares y tendían a adherirse al frasco de cultivo, tal como ocurre con las células mesenquimales normales (Figura 27). No se evidenció ninguna alteración en ninguno de los cultivos celulares generados en esta Tesis Doctoral.



*Figura 27. Fotografía de microscopía de contraste de fases de un cultivo de ADSC. Se aprecia la morfología elongada o estrellada de las células adheridas a la superficie de cultivo.*

En segundo lugar, la combinación de las células con los biomateriales de fibrina-agarosa descritos en el apartado Material y Métodos de la presente Tesis Doctoral, junto con la aplicación de métodos de nanoestructuración, permitió obtener láminas de tejido artificial celulares o acelulares de consistencia similar a la de una fina membrana (Figura 28 A). Cuando estas láminas se sometieron a los procesos de biofabricación descritos en la metodología de esta Tesis Doctoral, se obtuvieron sustitutos óseos cilíndricos celulares o acelulares compuestos por el biomaterial nanoestructurado y, en el caso de

los constructos celulares, células diferenciadas a la estirpe osteogénica en su interior (Figura 28 B).

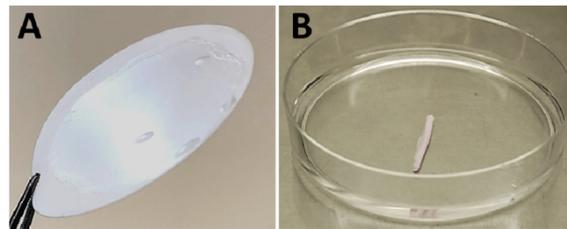


Figura 28. Imagen macroscópica del modelo de sustituto óseo basado en biomateriales nanoestructurados de fibrina-agarosa y células madre mesenquimales diferenciadas hacia la estirpe osteogénica generado en la presente Tesis Doctoral. A: biomaterial nanoestructurado sobre una membrana porosa de nylon (en blanco). B: Sustituto óseo nanoestructurado y enrollado sobre sí mismo para formar un cilindro sólido depositado en una placa de Petri.

#### 4.2 ANÁLISIS DEL MODELO DE HUESO HUMANO ARTIFICIAL NANOESTRUCTURADO OBTENIDO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.

En primer lugar, el análisis biomecánico del hueso artificial demostró que los tejidos artificiales generados en la presente Tesis Doctoral presentaban un módulo de Young promedio de  $0.49 \pm 0.07$  MPa, así como un esfuerzo de tracción a la rotura de  $0.99 \pm 0.23$  MPa, con una carga a la rotura de  $0.77 \pm 0.18$  N y una extensión de deformación a la rotura de  $28.77 \pm 9.15$  mm (Figura 29).

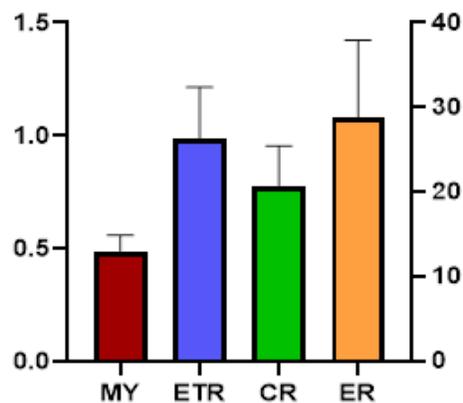
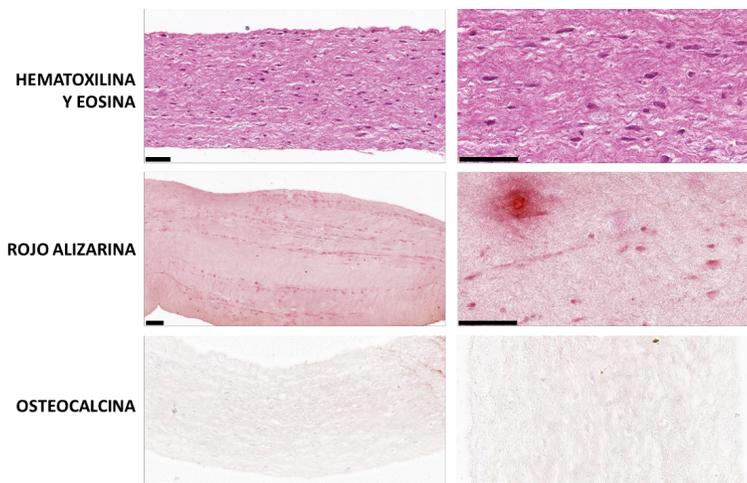


Figura 29. Resultados del análisis biomecánico de los sustitutos generados mediante ingeniería tisular. MY: Módulo de Young; ETR: Esfuerzo de tracción a la rotura; CR: Carga a la rotura; ER: Extensión de deformación a la rotura. La escala de la derecha corresponde a la ER.

En segundo lugar, los análisis histológicos realizados al sustituto óseo generado mediante ingeniería tisular utilizando la tinción de hematoxilina y eosina (Figura 30) revelaron la presencia de un biomaterial fibrilar de estructura regular y homogénea, en el que las fibrillas tendrían a orientarse de forma paralela al eje mayor del biomaterial. Asimismo, las células cultivadas en su interior presentaban una morfología elongada, ovalada o redondeada, sin que se apreciaran las típicas extensiones celulares de las células madre mesenquimales (Figura 31).

Cuando los sustitutos tisulares se analizaron mediante la técnica histoquímica de rojo alizarina, se encontró que las células inmersas en el biomaterial nanoestructurado de fibrina-agarosa presentaban marcaje moderado para este marcador de mineralización (Figura 30). Sin embargo, la tinción inmunohistoquímica para osteocalcina mostró muy bajo nivel de expresión para este marcador óseo, siendo negativa su expresión en la gran mayoría de las células (Figura 30).



*Figura 30. Análisis histológico de los sustitutos generados mediante ingeniería tisular. Se muestran imágenes ilustrativas de la tinción con hematoxilina-eosina, rojo alizarina y osteocalcina. Las imágenes de la derecha corresponden a microfotografías a gran aumento. Barra de escala: 50  $\mu$ m.*

3. Análisis de biocompatibilidad del modelo de hueso humano artificial nanoestructurado obtenido mediante ingeniería tisular.

Para determinar la biocompatibilidad del tejido artificial, se procedió a su implante *in vivo* en animales inmunodeficientes. A nivel macroscópico, los resultados muestran una buena integración del tejido artificial en la mandíbula de la rata, sin que se haya encontrado ninguna reacción local ni desarrollo de lesiones proliferativas sugerentes de malignización o cualquier otro tipo de complicación o efecto secundario local (Figura 31).



Figura 31 Análisis macroscópico de un animal en el que se injertó el sustituto de hueso humano en el que se aprecia que no existe reacción proliferativa local ni ningún tipo de complicación macroscópica aparente. A la derecha, se muestra el animal después de separar la piel.

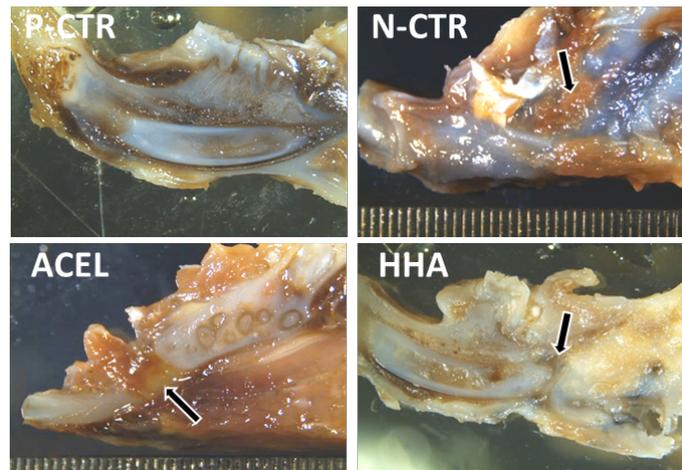
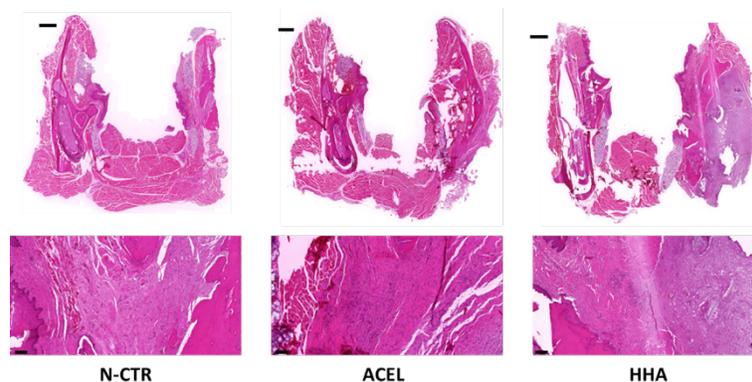


Figura 32. Análisis macroscópico de la zona del implante, una vez fijado y descalcificado el tejido, de los animales incluidos en el grupo P-CTR (control positivo no operado), N-CTR (control negativo), ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular). En ninguno de los casos se aprecia ningún tipo de complicación o efecto secundario detectable. Las flechas señalan la zona del defecto.

A nivel microscópico, las imágenes histológicas correspondientes a la tinción con hematoxilina-eosina confirmaron la ausencia de complicaciones a nivel del implante. Como se muestra en la Figura 33, ninguno de los animales analizados en esta Tesis Doctoral presentó signos de rechazo, proliferación anómala, hemorragia, siendo todas las imágenes compatibles con una adecuada integración y biocompatibilidad del injerto.



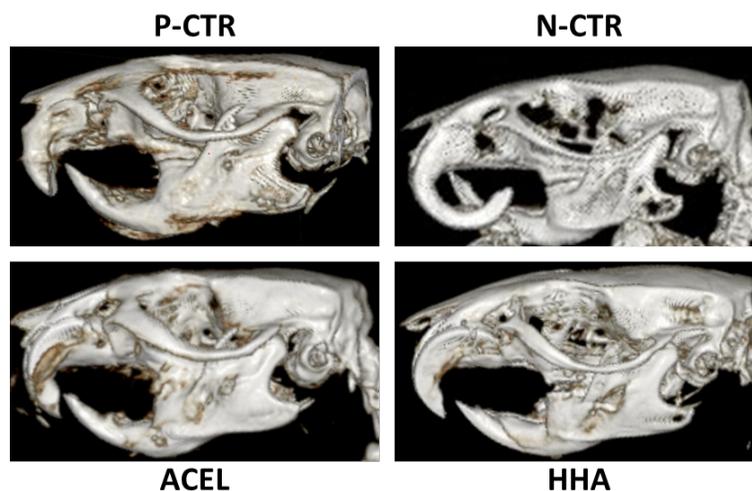
*Figura 33. Análisis microscópico de la zona del implante de los animales incluidos en el grupo N-CTR (control negativo), ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular). El lado izquierdo de cada animal se utilizó como control de hueso mandibular no intervenido. En ninguno de los casos se aprecia ningún tipo de complicación o efecto secundario detectable. Todos los tejidos fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Las barras de escala corresponden a 1 mm en las figuras superiores y a 100 µm en las inferiores.*

### **4.3 ANÁLISIS DE FUNCIONALIDAD DEL MODELO DE HUESO HUMANO ARTIFICIAL NANOESTRUCTURADO OBTENIDO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.**

#### **4.3.1 Análisis morfológico y simetría del cráneo**

El análisis morfológico de los animales incluidos en la presente Tesis Doctoral reveló varias diferencias entre los grupos (Figura 34). Cuando se analizaron los animales P-CTR (ratas nativas), encontramos que la morfología de los dientes era normal, lo que permitía una función fisiológica de mordida, y la morfología craneofacial del animal era

simétrica. Por el contrario, los animales del grupo N-CTR presentaron importantes alteraciones, que resultaron estadísticamente significativas en comparación con el grupo P-CTR ( $p < 0.0001$  para el test exacto de Fisher). En concreto, el 75% de los animales de este grupo presentaron alteraciones de la morfología dental (principalmente, sobrecrecimiento y desplazamiento de los incisivos superiores), con alteraciones de la mordida en el 50% de los casos (retracción mandibular y maloclusión) y asimetría facial en el 75% de los animales. En el grupo de animales en los que se implantó un constructo acelular, encontramos un 25% de casos con alteraciones de la morfología dental ( $p < 0.0001$  frente a P-CTR y frente a N-CTR), sin que existieran alteraciones de la mordida o asimetría facial en ningún caso. Finalmente, los animales del grupo HHA en los que se implantó un hueso artificial humano generado mediante ingeniería tisular mostraron alteraciones de la morfología dental en el 38% de los casos ( $p < 0.0001$  frente a P-CTR y frente a N-CTR), y un 12,5% de casos presentaron alteraciones de la mordida o asimetría facial.

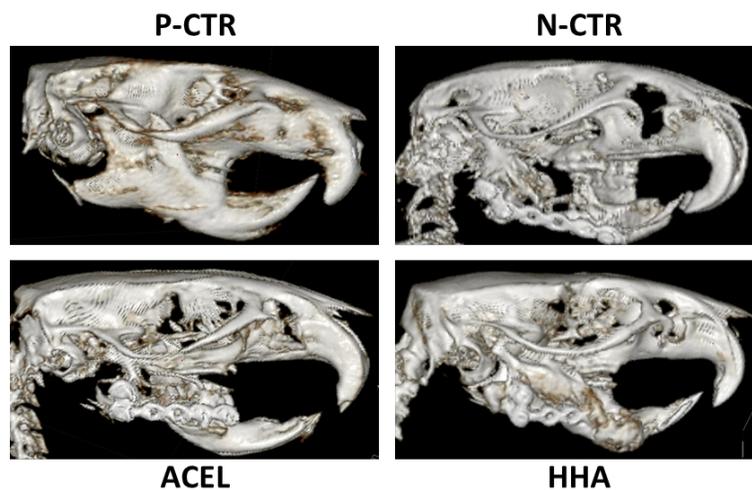


*Figura 34. Imágenes de reconstrucción 3D del esqueleto craneofacial (lado no intervenido) de los animales incluidos en el grupo P-CTR (control positivo no operado), N-CTR (control negativo), ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular). Se aprecia la morfología anómala de los incisivos del grupo N-CTR.*

#### 4.3.2 Análisis radiológico de la zona del defecto crítico mandibular

##### 4.3.2.1 *Análisis cualitativo de la zona del defecto.*

El análisis de la mandíbula de cada animal utilizando tomografías y reconstrucción 3D mostró diferencias entre los diferentes grupos de estudio. En primer lugar, las imágenes del lado intervenido en cada animal (Figura 35) mostraron la presencia de un hueso mandibular normal, sin defectos ni soluciones de continuidad, en el grupo P-CTR, mientras que el grupo N-CTR presentó un defecto mandibular de gran tamaño, identificable bajo la placa de osteosíntesis utilizada para estabilizar los fragmentos de la mandíbula. Cuando se analizó en grupo ACEL, se encontró asimismo un defecto mandibular que, en apariencia, presentaba menor tamaño que en los animales N-CTR. Finalmente, los animales del grupo HHA presentaron un defecto de muy pequeño tamaño que contenía tejido en su interior.



*Figura 35. Imágenes de reconstrucción 3D del esqueleto craneofacial (lado intervenido) de los animales incluidos en el grupo P-CTR (control positivo no operado), N-CTR (control negativo), ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular). En los animales de los grupos NCTR, ACEL y HHA, se observa la placa de osteosíntesis.*

Para confirmar estos resultados, se procedió a la evaluación cualitativa del sitio del defecto en cada grupo de estudio, utilizando reconstrucciones 3D de la cara inferior de cada animal. Como se muestra en la Figura 36, estos análisis confirmaron la presencia

de un hueso mandibular normal en el grupo P-CTR, mientras que los animales N-CTR mostraron un gran defecto óseo a nivel del hueso mandibular, que no parecía contener tejido radiodenso en su interior. En cuanto a los animales del grupo ACEL, se observó asimismo un defecto óseo mandibular, aunque el tamaño de este defecto fue menor comparado con los animales N-CTR. Respecto al grupo HHA, se confirmó que el defecto presentaba menor tamaño aparente que en los grupos anteriores, así como la existencia de tejido de diferente consistencia en el interior de dicho defecto.

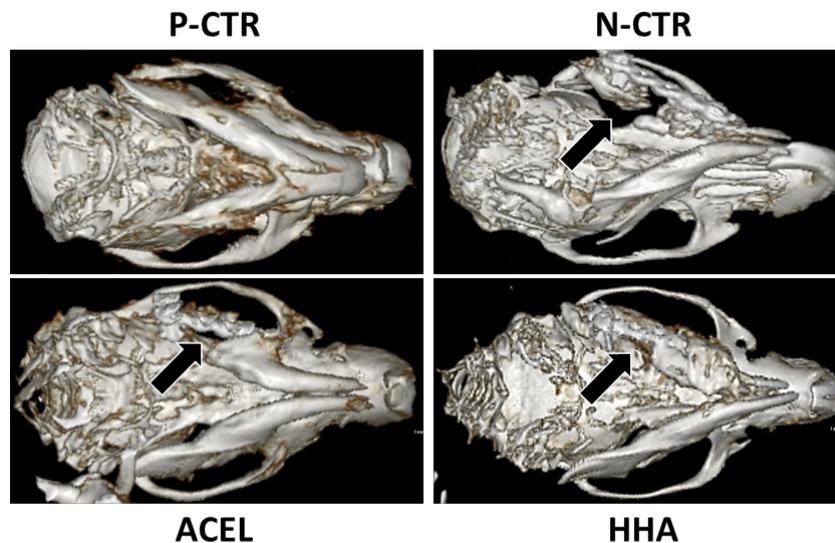


Figura 36. Imágenes de reconstrucción 3D del esqueleto craneofacial (vista inferior) de los animales incluidos en el grupo P-CTR (control positivo no operado), N-CTR (control negativo), ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular). En los animales de los grupos N-CTR, ACEL y HHA, se observa la placa de osteosíntesis. Las flechas señalan la zona del defecto.

#### 4.3.2.2 Análisis cuantitativo de la zona del defecto.

Por un lado, la cuantificación del tamaño del defecto creado a nivel de la mandíbula en el momento del sacrificio mostró diferencias significativas entre todos los grupos de estudio. Como se puede apreciar en la Figura 37, los animales del grupo N-CTR presentaron un defecto cuyo tamaño medio era de  $79.95 \pm 9.5$  mm, siendo de  $51.82 \pm 2.89$  mm en los animales del grupo ACEL y de  $17.78 \pm 5.34$  mm en el grupo HHA.

Las diferencias entre los tres grupos resultaron estadísticamente significativas ( $p=0.0079$  para todas las comparaciones).

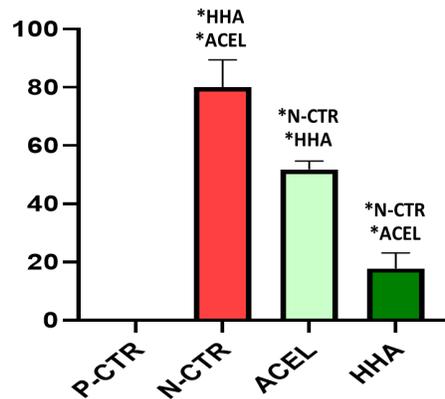
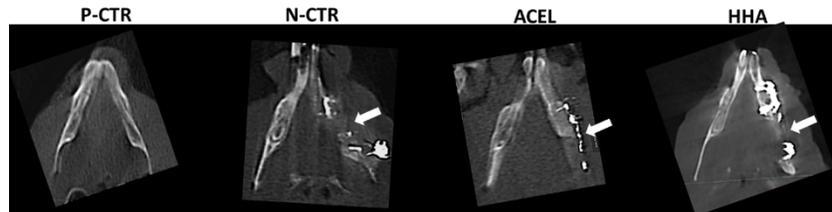


Figura 37. Tamaño del defecto mandibular en los animales incluidos en el grupo P-CTR (control positivo no operado), N-CTR (control negativo), ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular), al final del periodo de seguimiento. Para cada grupo de estudio, se muestran los valores medios, así como la desviación estándar. Los valores que resultaron estadísticamente diferentes de otros grupos se han marcado con asteriscos, seguidos del grupo con el cual presentaron diferencias significativas.

Por otro lado, se observó que la radiodensidad del tejido encontrado a nivel del defecto mandibular presentó diferencias entre los distintos grupos de estudio. Como se muestra en la Figura 38, el hueso mandibular derecho presentaba muy alta densidad radiológica en los animales del grupo P-CTR ( $2742,78 \pm 1170,98$  U.H.), que no fue significativamente diferente ( $p=0.5887$ ) a la del hueso mandibular izquierdo ( $1963,00 \pm 1249,90$ ). En el caso del NCTR, el tejido correspondiente al defecto generado en el lado derecho de la mandíbula presentó muy escasa radiodensidad ( $546,71 \pm 130,69$ ), siendo significativamente ( $p=0.0022$ ) inferior a la del lado izquierdo, utilizado como control ( $2516,46 \pm 370,18$ ). De igual modo, el análisis de los animales del grupo ACEL reveló diferencias significativas ( $p=0.0022$ ) entre el lado intervenido y el lado no intervenido de la mandíbula ( $546,71 \pm 130,69$  y  $2516,46 \pm 370,18$ , respectivamente). En cuanto al grupo HHA, se encontró que el tejido generado a nivel del defecto mandibular creado en el lado derecho tenía una radiodensidad significativamente

inferior a la del lado izquierdo utilizado como control ( $884,29 \pm 116,00$  U.H. y  $2141,94 \pm 328,73$  U.H., respectivamente) ( $p=0.0022$ ).



*Figura 38. Imágenes de cortes tomográficos obtenidos a nivel del defecto mandibular de los animales incluidos en el grupo P-CTR (control positivo no operado), N-CTR (control negativo), ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular). En los animales de los grupos N-CTR, ACEL y HHA, se observa la placa de osteosíntesis. Las flechas señalan la zona del defecto.*

La comparación entre los cuatro grupos de estudio de la radiodensidad obtenida en el lado derecho (Figura 39) reveló, en primer lugar, que el PCTR era significativamente superior a los otros tres grupos ( $p=0.0022$  para N-CTR, ACEL y HHA). En segundo lugar, se comprobó que la radiodensidad obtenida en el defecto del grupo N-CTR resultó ser significativamente inferior a la del P-CTR y HHA ( $p=0.0022$  en ambos casos), pero fue comparable a la del grupo ACEL ( $p= 0.9372$ ), mientras que HHA fue significativamente inferior a P-CTR ( $p=0.0022$ ) y significativamente superior a N-CTR y a ACEL ( $p=0.0022$  en ambos casos).

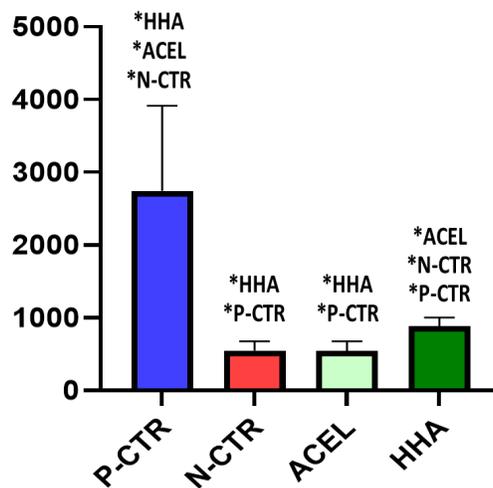


Figura 39. Cuantificación de la señal radiológica obtenida a nivel del defecto mandibular, medida en unidades Hounsfield (U.H.), en los animales incluidos en el grupo P-CTR (control positivo no operado), N-CTR (control negativo), ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular). Para cada grupo de estudio, se muestran los valores medios, así como la desviación estándar. Los valores que resultaron estadísticamente diferentes de otros grupos se han marcado con asteriscos, seguidos del grupo con el cual presentaron diferencias significativas.

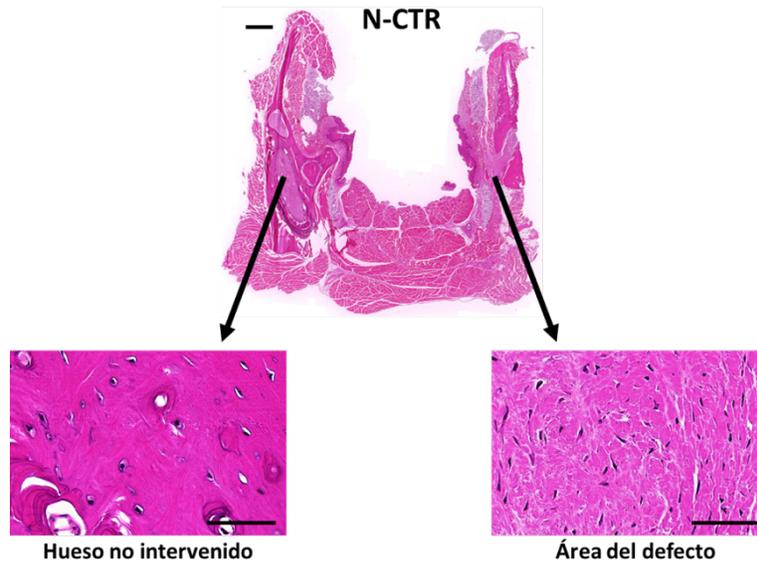
#### 4.4 ANÁLISIS HISTOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA ZONA DEL DEFECTO CRÍTICO MANDIBULAR

##### 4.4.1 Análisis histológico de la zona del defecto.

Para determinar la utilidad del modelo de hueso artificial humano generado en esta Tesis Doctoral en regeneración ósea mandibular, se procedió al análisis histológico de los tejidos de cada grupo e estudio utilizando tinciones de hematoxilina y eosina.

A este respecto, el análisis del hueso mandibular correspondiente al grupo N-CTR reveló la presencia de un hueso de apariencia normal en el lado izquierdo (no intervenido), y la presencia de un tejido blando compatible con tejido conectivo en la zona del defecto (Figura 40). Este tejido estaba compuesto en su mayor parte por una matriz conectiva densa compatible con la presencia de fibras de colágeno y numerosas

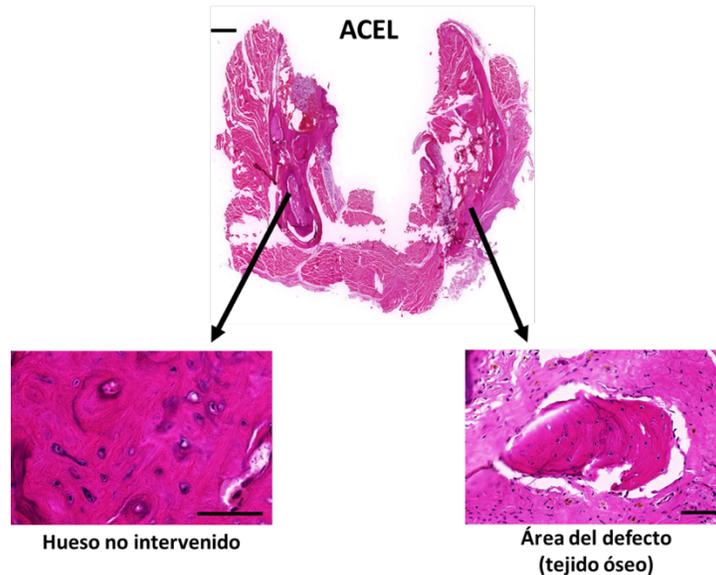
células de morfología típica fibroblástica, no existiendo tejido óseo detectable en esta zona.



*Figura 40. Análisis histológico de un animal correspondiente al grupo NCTR (control negativo) utilizando la tinción de hematoxilina y eosina. En la parte superior, se muestra un corte en el plano coronal a nivel de la zona del defecto, en la que se aprecia el hueso mandibular no intervenido (lado izquierdo) y el intervenido (lado derecho). En la parte inferior, se muestran imágenes de mayor magnificación de ambas zonas. La barra de escala de la imagen superior corresponde a 1 mm, mientras que las de las imágenes inferiores corresponden a 50  $\mu$ m.*

El análisis del grupo ACEL mostró, asimismo, un hueso histológicamente normal en el lado no intervenido. En el lado intervenido, se apreció un tejido conectivo rico en fibras de colágeno y células fibroblásticas similar al encontrado en el grupo N-CTR. Sin embargo, este tejido conectivo neoformado contenía algunos núcleos de osificación en los que aparecía tejido óseo, tal como se muestra en la Figura 41. La cuantificación del

número de núcleos de osificación mostró un promedio de  $1,25 \pm 0,35$  áreas de osificación por animal del grupo ACEL.



*Figura 41. Análisis histológico de un animal correspondiente al grupo ACEL (implante de un constructo acelular) utilizando la tinción de hematoxilina y eosina. En la parte superior, se muestra un corte en el plano coronal a nivel de la zona del defecto, en la que se aprecia el hueso mandibular no intervenido (lado izquierdo) y el intervenido (lado derecho). En la parte inferior, se muestran imágenes de mayor magnificación de ambas zonas. La barra de escala de la imagen superior corresponde a 1 mm, mientras que las de las imágenes inferiores corresponden a 50  $\mu$ m.*

Cuando se analizaron los animales del grupo HHA, se encontró que, al igual que en los grupos anteriores, el hueso mandibular correspondiente al lado izquierdo presentaba una estructura histológica compatible con un hueso maduro normal. Por el contrario, el lado intervenido estaba en su mayor parte ocupado por tejido blando rico en fibras de colágeno y fibroblastos, pero en su interior se encontraron varios núcleos de osificación (promedio de  $3,00 \pm 1,41$  por animal del grupo HHA), e incluso algunas zonas que contenían tejido cartilaginoso histológicamente normal (Figura 42)

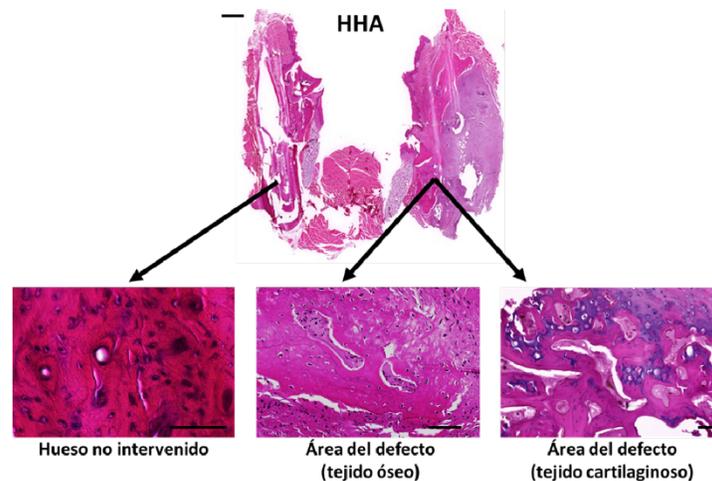


Figura 42. Análisis histológico de un animal correspondiente al grupo HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular) utilizando la tinción de hematoxilina y eosina. En la parte superior, se muestra un corte en el plano coronal a nivel de la zona del defecto, en la que se aprecia el hueso mandibular no intervenido (lado izquierdo) y el intervenido (lado derecho). En la parte inferior, se muestran imágenes de mayor magnificación de ambas zonas. La barra de escala de la imagen superior corresponde a 1 mm, mientras que las de las imágenes inferiores corresponden a 50  $\mu$ m.

#### 4.4.2 Análisis histoquímico de la zona del defecto.

Para evaluar la presencia de depósitos de calcio en la zona del defecto, se procedió al análisis histoquímico de cada grupo de estudio utilizando rojo alizarina. Como se puede observar en la Tabla 3 y en la Figura 43, los resultados confirman la presencia de material mineralizado de alta densidad en el hueso normal correspondiente al control P-CTR, y su ausencia en el tejido encontrado en la zona de la lesión del grupo N-CTR. Cuando se cuantificaron los niveles de mineralización en cada grupo de estudio, se encontró que el grupo P-CTR fue estadísticamente comparable a la de los núcleos de hueso encontrados en el grupo HHA, siendo las diferencias, no significativas. Sin embargo, los niveles de mineralización fueron significativamente inferiores en el hueso encontrado en el grupo ACEL y en el cartílago del grupo HHA.

	ROJO ALIZARINA	ROJO PICROSIRIUS	AZUL ALCIÁN	AZUL DE TOLUIDINA
P-CTR	117.4±15.17	195.3±8.47	87.5±17.93	40.8±13.04
N-CTR	48.1±25.31	82.2±35.9	46.4±10.96	49.7±22.44
ACEL (hueso)	102.2±14.35	181.8±12.87	29.6±10.17	35.4±11.28
HHA (hueso)	127.4±30.28	176.4±16.79	42.1±22.18	65.6±20.48
HHA (cartílago)	60.6±28.99	145.4±38.59	36.4±26.4	125.9±79.95
P-CTR vs. N-CTR	0.0000	0.0000	0.0002	0.4813
P-CTR vs. ACEL (hueso)	0.0232	0.0185	0.0000	0.2475
P-CTR vs. HHA (hueso)	0.4813	0.0021	0.0002	0.0068
P-CTR vs. HHA (cartílago)	0.0007	0.0000	0.0002	0.0433
N-CTR vs. ACEL (hueso)	0.0001	0.0000	0.0029	0.1903
N-CTR vs. HHA (hueso)	0.0001	0.0000	0.4359	0.0892
N-CTR vs. HHA (cartílago)	0.2475	0.0021	0.1903	0.0892
ACEL (hueso) vs. HHA (hueso)	0.0630	0.5288	0.2475	0.0007
ACEL (hueso) vs. HHA (cartílago)	0.0015	0.0147	0.8534	0.0185
HHA (hueso) vs. HHA (cartílago)	0.0002	0.0232	0.3527	0.2176

*Tabla 3. Cuantificación de la señal histoquímica correspondiente a la zona del defecto en cada grupo de estudio. Para cada método histoquímico y cada grupo de estudio, se muestran los valores promedio y las desviaciones estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de significación estadística para la comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes grupos de estudio. Los valores estadísticamente significativos se han marcado en color rojo.*

Generación de un sustituto óseo humano mediante ingeniería tisular para el tratamiento de defectos mandibulares.

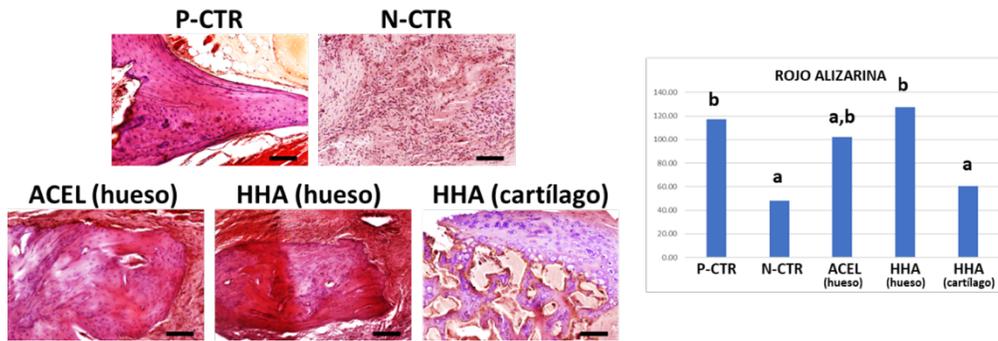


Figura 43 Análisis histoquímico del tejido óseo y cartilaginoso encontrado en la zona del defecto de los grupos ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular) utilizando la tinción de rojo alizarina. Como controles, se muestran los resultados obtenidos en el grupo P-CTR (control positivo) y en el grupo N-CTR (control negativo). Escala: 100  $\mu$ m. La gráfica de la derecha corresponde a los valores de cuantificación de la señal histoquímica obtenida en cada caso, en la que las diferencias significativas respecto al P-CTR se marcan con "a" y las diferencias significativas respecto al N-CTR se marcan con "b".

Para determinar la presencia de fibras de colágeno en el defecto creado en cada animal, las diferentes muestras histológicas se tiñeron con rojo picosirius (Tabla 3 y Figura 44). A este respecto, se comprobó que los mayores niveles de tinción histoquímica de rojo picosirius correspondieron al grupo P-CTR, existiendo diferencias significativas con todos los demás grupos del estudio, mientras que los niveles más bajos se encontraron en el grupo N-CTR, con diferencias significativas respecto a todos los demás grupos. Respecto a los núcleos óseos encontrados en los grupos ACEL y HHA, ambos mostraron señal histoquímica significativamente superior a la del cartilago, pero fueron estadísticamente similares entre sí.

Generación de un sustituto óseo humano mediante ingeniería tisular para el tratamiento de defectos mandibulares.

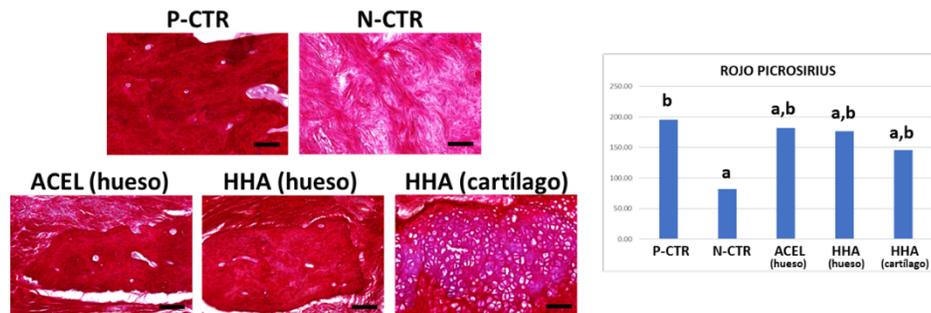


Figura 44. Análisis histoquímico para rojo picosirius del tejido óseo y cartilaginoso encontrado en la zona del defecto de los grupos ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular). Como controles, se muestran los resultados obtenidos en el grupo P-CTR (control positivo) y en el grupo N-CTR (control negativo). Escala: 100  $\mu$ m. La gráfica de la derecha corresponde a los valores de cuantificación de la señal histoquímica obtenida en cada caso, en la que las diferencias significativas respecto al PCTR se marcan con "a" y las diferencias significativas respecto al N-CTR se marcan con "b".

Por otro lado, se analizó la presencia de proteoglicanos en la zona del defecto de cada grupo de estudio utilizando histoquímica para azul alcian. Como se muestra en la Tabla 3 y la Figura 45, se comprobó que los mayores niveles de intensidad de tinción histoquímica de azul alcian correspondieron al grupo P-CTR, con diferencias significativas respecto a todos los demás grupos. Sin embargo, los demás grupos de estudio mostraron bajos niveles de tinción de azul alcian, siendo similares al N-CTR los valores encontrados en el hueso y cartílago del grupo HHA, y significativamente inferiores al grupo N-CTR en el hueso correspondiente al grupo ACEL.

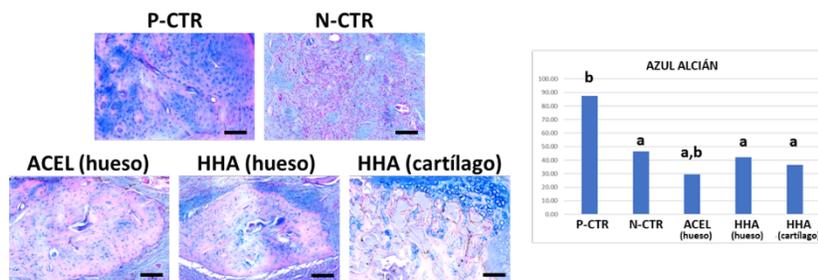


Figura 45. Análisis histoquímico para azul alcian del tejido óseo y cartilaginoso encontrado en la zona del defecto de los grupos ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular). Como controles, se muestran los resultados obtenidos en el grupo P-CTR (control positivo) y en el grupo N-CTR (control negativo). Escala: 100  $\mu$ m. La gráfica de la derecha corresponde a los valores de cuantificación de la señal histoquímica obtenida en cada caso, en la que las diferencias significativas respecto al PCTR se marcan con "a" y las diferencias significativas respecto al N-CTR se marcan con "b".

El análisis de la zona del defecto utilizando la tinción histoquímica de azul de toluidina reveló importantes diferencias entre los diferentes grupos de estudio. En concreto, estos resultados mostraron que el hueso nativo normal del grupo P-CTR presentaba bajos niveles de tinción para este marcador, siendo estos niveles estadísticamente comparables a los del grupo N-CTR y al hueso encontrado en el grupo ACEL. Sin embargo, tanto el hueso como el cartílago formado en el defecto del grupo HHA mostraron una señal significativamente más intensa que la que se encontró en P-CTR (Tabla 3 y Figura 46)

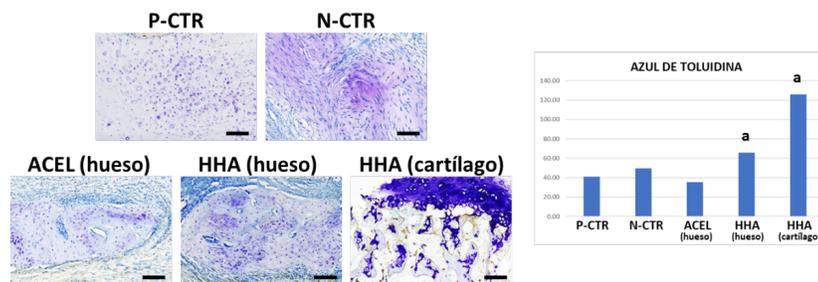


Figura 46 Análisis histoquímico para azul de toluidina del tejido óseo y cartilaginoso encontrado en la zona del defecto de los grupos ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular). Como controles, se muestran los resultados obtenidos en el grupo P-CTR (control positivo) y en el grupo N-CTR (control negativo). Escala: 100  $\mu$ m. La gráfica de la derecha corresponde a los valores de cuantificación de la señal histoquímica obtenida en cada caso, en la que las diferencias significativas respecto al PCTR se marcan con "a" y las diferencias significativas respecto al N-CTR se marcan con "b".

#### 4.3.3. Análisis inmunohistoquímico de la zona del defecto.

El análisis de expresión de la proteína ósea osteocalcina en cada grupo de estudio reveló la existencia de diferencias entre los distintos animales. Como se muestra en la Tabla 4 Figura 47, hueso nativo del grupo P-CTR mostró señal positiva

para osteocalcina, siendo esta señal significativamente superior a la que se encontró en el tejido formado en el defecto del grupo N-CTR y en el cartílago encontrado en el grupo HHA. Cuando se analizó el tejido óseo formado en el defecto de los grupos ACEL y HHA, se encontró que el hueso del grupo ACEL expresó niveles de osteocalcina similares a los del hueso P-CTR, mientras que el hueso de HHA expresó niveles significativamente superiores a los de P-CTR.

	OSTEOCALCINA	VERSIÁN
P-CTR	59.3±9.59	66.6±20.13
N-CTR	23.7±4.72	48.7±16.01
ACEL (hueso)	58.9±18.95	78.3±33.41
HHA (hueso)	90.7±26.94	77.7±10.23
HHA (cartílago)	36.6±13.75	38±7.02
P-CTR vs. N-CTR	0.0000	0.0753
P-CTR vs. ACEL (hueso)	0.9705	0.4813
P-CTR vs. HHA (hueso)	0.0021	0.1655
P-CTR vs. HHA (cartílago)	0.0021	0.0001
N-CTR vs. ACEL (hueso)	0.0000	0.0147
N-CTR vs. HHA (hueso)	0.0000	0.0005
N-CTR vs. HHA (cartílago)	0.0115	0.1903
ACEL (hueso) vs. HHA (hueso)	0.0052	0.4359
ACEL (hueso) vs. HHA (cartílago)	0.0068	0.0007
HHA (hueso) vs. HHA (cartílago)	0.0005	0.0000

*Tabla 4. Cuantificación de la señal inmunohistoquímica correspondiente a la zona del defecto en cada grupo de estudio. Para cada marcador inmunohistoquímico y cada grupo de estudio, se muestran los valores promedio y las desviaciones estándar. En las filas inferiores, se muestran los valores p de significación estadística para la comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes grupos de estudio. Los valores estadísticamente significativos se han marcado en color rojo.*

Generación de un sustituto óseo humano mediante ingeniería tisular para el tratamiento de defectos mandibulares.

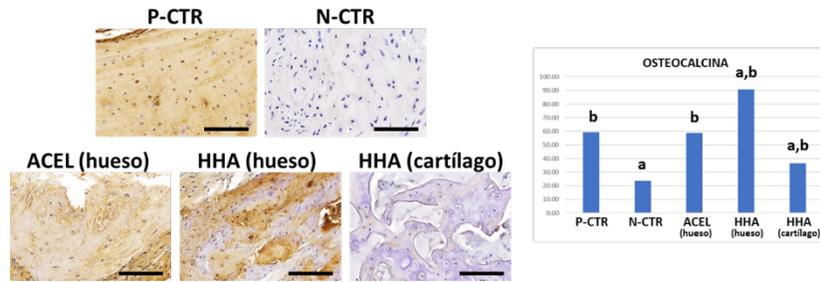


Figura 47. Análisis inmunohistoquímico para osteocalcina del tejido óseo y cartilaginoso encontrado en la zona del defecto de los grupos ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular). Como controles, se muestran los resultados obtenidos en el grupo P-CTR (control positivo) y en el grupo N-CTR (control negativo). Escala: 100  $\mu$ m. La gráfica de la derecha corresponde a los valores de cuantificación de la señal histoquímica obtenida en cada caso, en la que las diferencias significativas respecto al PCTR se marcan con "a" y las diferencias significativas respecto al N-CTR se marcan con "b".

Por último, la cuantificación de versicán en los diferentes grupos de estudio utilizando técnicas inmunohistoquímicas mostró la que esta proteína asociada a la matriz extracelular estaba presente en todos los grupos de estudio. En general, la expresión no fue muy intensa en ningún grupo, y las diferencias entre P-CTR y N-CTR, ACEL y el hueso de HHA no fueron estadísticamente significativas, aunque sí fue significativamente inferior en el cartílago de HHA. Asimismo, se encontró que el hueso de ACEL y HHA fue significativamente superior al grupo N-CTR, y el cartílago de HHA fue significativamente inferior al grupo N-CTR.

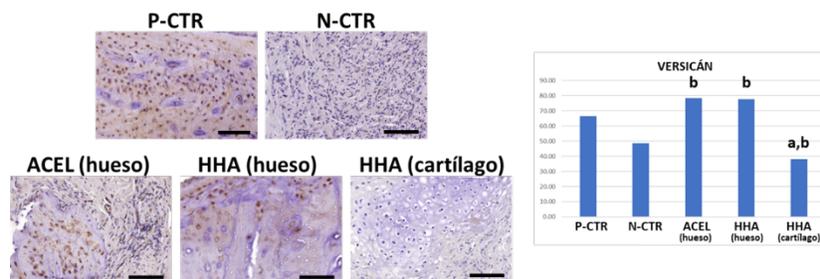


Figura 48 Análisis inmunohistoquímico para versicán del tejido óseo y cartilaginoso encontrado en la zona del defecto de los grupos ACEL (implante de un constructo acelular) y HHA (implante de un sustituto de hueso humano artificial generado por ingeniería tisular). Como controles, se muestran los resultados obtenidos en el grupo P-CTR (control positivo) y en el grupo N-CTR (control negativo). Escala: 100  $\mu$ m. La gráfica de la derecha corresponde a los valores de cuantificación de la señal histoquímica obtenida en cada caso, en la que las diferencias significativas respecto al PCTR se marcan con "a" y las diferencias significativas respecto al N-CTR se marcan con "b".

# DISCUSIÓN

## 5 DISCUSIÓN

El tratamiento de los defectos óseos mandibulares es complejo, especialmente en aquellos casos en los que la pérdida de tejido óseo es de gran tamaño (Paré et al., 2022; Dalfino et al., 2023; Yan et al., 2023). En la mayoría de los casos, el tratamiento requiere múltiples intervenciones quirúrgicas que no siempre ofrecen el resultado esperado (Rao et al., 2023). En el caso de los pacientes en edad pediátrica, el tratamiento es aún más complejo, pudiendo generar alteraciones del crecimiento maxilofacial y diferentes tipos de secuelas del desarrollo craneal (Torroni et al., 2015). Uno de los principales tratamientos utilizados en la actualidad para la reparación de los defectos mandibulares son los injertos autólogos, que no están exentos de complicaciones y efectos secundarios para los pacientes, como se detalló en la introducción de la presente Tesis Doctoral (Ku et al., 2023). Por ello, se hace necesario profundizar en el desarrollo y optimización de nuevas alternativas terapéuticas de carácter regenerativo capaces de mejorar los resultados de los tratamientos actualmente disponibles.

En este contexto, la Ingeniería Tisular surge como una novedosa disciplina que permite generar tejidos artificiales potencialmente útiles para la regeneración tisular, incluyendo el tejido óseo, habiéndose descrito un gran número de sustitutos óseos hasta la fecha (Bosch-Rué et al., 2023; Nasir et al., 2023; Ramzan et al., 2023). Sin embargo, ninguno de estos sustitutos óseos es plenamente funcional, lo que obliga a seguir investigando en este campo. En la presente Tesis Doctoral, se han logrado generar nuevos sustitutos de hueso artificial combinando biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurados con células madre mesenquimales diferenciadas hacia la estirpe osteoblástica. Aunque este biomaterial ya demostró utilidad en la regeneración de distintos tejidos y órganos, incluyendo la córnea (Alaminos et al., 2006; De La Cruz Cardona et al., 2011; González-Gallardo et al., 2023), mucosa oral (Alaminos et al., 2007; Garzón et al., 2009; Blanco-Elices et al., 2021), piel (Carriel et al., 2012; Egea-Guerrero

et al., 2019), nervio (Carriel et al., 2017) y paladar (Fernández-Valadés-Gámez et al., 2016; Martín-Piedra et al., 2017), entre otras estructuras, es la primera vez que la fibrina-agarosa nanoestructurada se utiliza para tratar una lesión crítica del hueso mandibular.

La fabricación de tejidos artificiales de alta densidad, como es el caso del hueso, a partir de hidrogeles de escasas propiedades biomecánicas, supone un reto de la ingeniería tisular. A este respecto, el desarrollo de métodos y técnicas avanzadas de biofabricación que incluyen la nanoestructuración y la generación de cilindros macizos (Scionti et al., 2014; Carriel et al., 2017) han permitido fabricar constructos tridimensionales que podrían ser utilizados como sustitutos óseos. Basada en técnicas de compresión plástica previamente aplicadas a hidrogeles de colágeno (Mudera et al., 2007), la nanoestructuración permite eliminar la mayor parte del agua del biomaterial, generando reacciones intermoleculares entre los componentes del mismo, sin afectar a la viabilidad celular (Scionti et al., 2014). A su vez, los biomateriales nanoestructurados son susceptibles de modificación mediante distintas técnicas de biofabricación que permiten la generación de diferentes configuraciones tridimensionales, tales como cilindros, tubos, o estructuras multilaminares (Martín-Piedra et al., 2017).

Uno de los requerimientos de los tejidos artificiales generados por ingeniería tisular es la evaluación de sus propiedades físicas. Respecto al sustituto óseo generado en esta Tesis Doctoral, se demostró que las propiedades biomecánicas de los sustitutos óseos se encontraban en el rango de ciertos tejidos blandos humanos de alta densidad (Scionti et al., 2014), sin que llegaran a alcanzar las propiedades de los tejidos mineralizados que, de acuerdo con publicaciones previas, presentan valores de módulo de Young más de 100 veces superior (Liu et al., 2023). Aunque diferentes autores demostraron que la utilización de tejidos artificiales blandos es capaz de mejorar la regeneración ósea (Bai et al., 2023; Meghil et al., 2023; Zhu et al., 2023), lo cual coincide

con nuestros propios resultados, aún será necesario llevar a cabo estudios que permitan fabricar sustitutos óseos mineralizados que, por tanto, presenten mejores propiedades biomecánicas.

Junto a los estudios biomecánicos, el modelo de hueso artificial generado en la presente Tesis Doctoral y mantenido en cultivo fue sometido a distintos tipos de análisis citológicos e histológicos para determinar parámetros de calidad para futuro uso clínico, tal como establece la Agencia Española de Medicamentos y Productos Farmacéuticos (AEMPS) (Rico-Sánchez et al., 2019). A este respecto, pudimos comprobar que las células utilizadas para la generación del hueso artificial mostraban una morfología compatible con células normales en proceso de proliferación y con un metabolismo activo, sin que se apreciara ningún signo que sugiriera la existencia de alteraciones significativas. Estos resultados coinciden con análisis previamente publicados por el Grupo de Ingeniería Tisular en los que se demuestra que las células cultivadas en el biomaterial de fibrina-agarosa nanoestructurado mantienen patrones óptimos de viabilidad y funcionalidad celular y, por tanto, son adecuadas para futuro uso clínico (García-Martínez et al., 2017; Campos et al., 2018; Chato-Astrain et al., 2020). Por otro lado, los análisis histológicos revelaron la presencia de un biomaterial denso que contenía células de aspecto normal en su interior y que mostraban señal moderada para la técnica de rojo alizarina, aunque no de osteocalcina. En general, estos resultados sugieren que el modelo de hueso humano artificial nanoestructurado generado en esta Tesis Doctoral era compatible con un tejido artificial de aspecto normal, aunque con bajos niveles de diferenciación, en el que las células diferenciadas hacia la estirpe osteogénica, probablemente, están iniciando la síntesis de componentes mineralizados, aunque aún en bajo grado. Futuros estudios deberán determinar si estos tejidos son capaces de mostrar mayores niveles de diferenciación mientras se mantienen en cultivo *ex vivo*, tal como se demostró para otros tipos de tejidos, sin que estos tejidos fueran capaces de alcanzar diferenciación

terminal en cultivo (Garzón et al., 2009; González-Andrades et al., 2009; Viñuela-Prieto et al., 2015).

Una vez generado en laboratorio el sustituto óseo de fibrina-agarosa nanoestructurada, y tras realizar los controles de calidad a nivel biomecánico, citológico e histológico, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* para determinar su utilidad potencial en la regeneración ósea mandibular. La realización de estudios en animales de laboratorio es uno de los principales requerimientos de la AEMPS para determinar parámetros de bioseguridad y funcionalidad de los productos de terapias avanzadas generados en laboratorio (Rico-Sánchez et al., 2019). Para ello, se utilizó un modelo de rata atómica inmunodeficiente que permitió implantar tejidos artificiales que contenían células humanas sin la posibilidad de que existiera rechazo inmunológico del xenoinjerto debido al mal funcionamiento de los linfocitos T del animal receptor (Rolstad, 2001). Aunque el grupo investigación utilizó previamente el modelo de ratón atómico inmunodeficiente para la evaluación *in vivo* de tejidos artificiales generados mediante ingeniería tisular (Garzón et al., 2009; Carriel et al., 2012; Blanco-Elices et al., 2021), en este caso se optó por un animal de mayor tamaño, como es la rata desnuda, debido a la dificultad de generar osteotomías de tamaño crítico a nivel mandibular en animales de pequeño tamaño. Hasta la fecha, se han descrito varios modelos animales de lesión ósea mandibular utilizando, fundamentalmente, el ratón de laboratorio (Li et al., 2022), la rata (Higeuchi et al., 2023) y, en muy pocos casos, animales de mayor tamaño como el cerdo (Troeltzsch et al., 2023).

En lo que respecta al modelo de lesión, es importante señalar que en la presente Tesis Doctoral se utilizó un modelo de daño mandibular crítico de gran tamaño (1 cm en la rata) para determinar la utilidad del tejido artificial para mejorar los resultados actualmente disponibles en lesiones óseas de gran tamaño. La falta de tratamientos verdaderamente eficaces para tratar las lesiones críticas de gran extensión en el hueso

humano y los malos resultados obtenidos hasta el momento (Migliorini et al., 2021), obligaron a buscar alternativas terapéuticas basadas en la Ingeniería Tisular. La gran mayoría de estudios previamente publicados en el campo de la regeneración ósea mandibular utilizan defectos mandibulares de pequeño tamaño, siendo muy escasos los trabajos en los que se genera un defecto crítico (Marei et al., 2018; Awadeen et al., 2020; Dalfino et al., 2023) más aún, cuando el defecto crítico es de gran extensión, tal como se hizo en la presente Tesis Doctoral.

La realización de los estudios *in vivo* nos permitió demostrar, en primer lugar, que el implante de un sustituto óseo nanoestructurado de fibrina-agarosa es seguro para el animal receptor, por lo que podemos inferir que este producto cumple los requerimientos de bioseguridad de la AEMPS referentes a productos de terapias avanzadas utilizados clínicamente. Probablemente, la bioseguridad es el requisito más importante de este tipo de productos (Rico-Sánchez et al., 2019; Canceill et al., 2023; González-Gallardo et al., 2023), y la demostración de que el producto está libre de efectos adversos significativos debe ser previa al análisis de funcionalidad de dicho producto, según lo indicado por la AEMPS. En nuestro caso, se demostró que el sustituto óseo generado por ingeniería tisular, tanto el producto celular como el acelular, presentó adecuados niveles de biointegración en la zona del implante, no existiendo ninguna reacción detectable que pudiese asociarse a rechazo, inflamación, necrosis o malignización. Aunque habrá que llevar a cabo estudios moleculares en profundidad, estos estudios preliminares apoyan la seguridad del sustituto óseo utilizado para la regeneración de grandes defectos críticos del hueso mandibular y permiten continuar la caracterización del producto de cara a su futura utilización en pacientes. En cualquier caso, la realización de ensayos clínicos en fases tempranas deberá determinar la bioseguridad del producto aplicado a pacientes con graves defectos tisulares, tal como

se hizo con otros tejidos artificiales generados en laboratorio (González-Gallardo et al., 2023).

En segundo lugar, los estudios *in vivo* permitieron evaluar la funcionalidad del hueso artificial humano a la hora de promover la regeneración ósea en un modelo de defecto crítico mandibular de gran tamaño. En lo que respecta al efecto del implante sobre el crecimiento y desarrollo del esqueleto craneofacial, nuestros resultados mostraron la utilidad del hueso artificial a la hora de prevenir las alteraciones de los dientes y de la morfología facial, existiendo diferencias significativas respecto a los controles negativos, aunque los resultados no fueron plenamente satisfactorios en el 100% de los animales del estudio. Es bien sabido que el desarrollo del macizo craneofacial es un proceso altamente complejo en el que intervienen numerosos genes y factores ambientales que, en conjunto, inducen el crecimiento armónico y la diferenciación de numerosas estructuras con la participación de un gran número de moléculas inductoras y señales (Qin et al., 2023; Selleri y Rijli, 2023). En nuestro caso, la ausencia de una parte del hueso mandibular se asoció a una alteración significativa de estos procesos, los cuales, de algún modo, pudieron compensarse parcialmente en los animales tratados con el hueso artificial, incluso cuando se trataba de un hueso acelular, lo cual podría estar en relación con la gran cantidad de factores inductores presentes en el biomaterial utilizado para generar el hueso artificial (Shen et al., 2006; Verma et al., 2023). Aunque habrá que validar estos resultados en futuros ensayos clínicos de terapias avanzadas, los resultados preliminares obtenidos en la presente Tesis Doctoral avalan el uso del hueso artificial humano de fibrina-agarosa nanoestructurada para la prevención de los defectos del desarrollo craneofacial en pacientes con defectos mandibulares críticos. Aunque se trataba de un modelo animal diferente, trabajos previos realizados por el Grupo de Ingeniería Tisular lograron demostrar la utilidad de los tejidos artificiales basados en biomateriales de fibrina-agarosa para inducir un desarrollo armónico de las

estructuras maxilofaciales en conejos con defecto óseo del paladar (Liceras-Liceras et al., 2017; Martín-Piedra et al., 2017).

Por otro lado, se evaluó la capacidad del hueso artificial para mejorar la regeneración ósea a nivel del defecto crítico mandibular. A este respecto, los resultados obtenidos en los grupos en los que se implantó un sustituto óseo generado por ingeniería tisular demostraron, en general, la utilidad de dicho sustituto para mejorar la regeneración del hueso mandibular, aunque en ningún caso se logró una total reparación y regeneración del defecto óseo crítico de gran tamaño. De hecho, los análisis cualitativos realizados a nivel del defecto mandibular revelaron la presencia de un tejido reparativo a nivel del defecto en el grupo acelular y, especialmente, en el grupo celular, lo cual coincide con los estudios cuantitativos que demostraron la presencia de un defecto de menor tamaño en los animales sometidos a tratamiento con un sustituto óseo, sobre todo, cuando se utilizó un hueso artificial que contenía células. Sin embargo, el análisis de radiodensidad del tejido formado a nivel del defecto reveló que este tejido estaba constituido, fundamentalmente, por material blando no mineralizado o escasamente mineralizado que no alcanzaba los niveles del hueso normal, aunque su densidad resultó ser significativamente superior en el grupo tratado con un sustituto óseo que contenía células viables. Estos resultados, que concuerdan con la evaluación macroscópica cualitativa, sugieren que el implante de un hueso artificial, sobre todo cuando éste contenía células, es capaz de inducir la formación de un tejido regenerativo a nivel del defecto crítico mandibular, aunque este tejido aún tiene carácter inmaduro y no presenta los niveles de densidad del hueso normal. Numerosos trabajos previos ya demostraron la utilidad de distintos tipos de biomateriales para mejorar la regeneración ósea mandibular, aunque la mayoría de éstos se asocian a una mejora parcial, similar a la descrita en esta Tesis Doctoral (Dalfino et al., 2023), por lo que se ha sugerido la necesidad de desarrollar nuevos productos que incluyan factores angiogénicos, factores

de crecimiento y otro tipo de moléculas capaces de mejorar la regeneración ósea (Guo et al., 2023; Zhang et al., 2023).

A nivel histológico, nuestros resultados confirmaron la idea de que la utilización de un modelo de hueso artificial nanoestructurado generado por ingeniería tisular se asoció a la presencia, a nivel de la lesión, de un tejido rico en fibras densas de colágeno en el que existían núcleos de osificación detectables, así como zonas que contenían tejido cartilaginoso cuando se usó un sustituto óseo celular. Trabajos previos desarrollados por diferentes grupos de investigación ya demostraron que la aplicación de distintos biomateriales y/o tejidos artificiales a nivel de defectos críticos mandibulares es capaz de mejorar la regeneración ósea, pero habitualmente no son capaces de inducir la total regeneración del defecto mandibular (Ma et al., 2023). Aunque habrá que llevar a cabo estudios complementarios para dilucidar los motivos por los que el modelo de hueso artificial de fibrinaagarosa utilizado en la presente Tesis Doctoral no fue plenamente eficaz a la hora de inducir la regeneración ósea mandibular, la presencia de estos núcleos de hueso y cartílago podría indicar la existencia de un proceso regenerativo aún incipiente. Por ello, podríamos hipotetizar que estos núcleos de regeneración podrían desarrollarse con el tiempo, ocupando toda la zona de la lesión tras un periodo de tiempo más prolongado.

En este sentido, es bien sabido que la mayoría de los defectos óseos mandibulares generados en ratas de laboratorio son capaces de regenerar de forma completa después de 4 meses del procedimiento quirúrgico (Veremeev et al., 2020), motivo por el cual, en la presente Tesis Doctoral se analizaron todos los animales a este tiempo. Sin embargo, el modelo de lesión crítica mandibular generado en nuestro trabajo es un modelo de gran tamaño, mientras que los defectos críticos publicados previamente por la literatura corresponden a tamaños muy inferiores de lesión ósea (típicamente, de 4 a 5 mm) (Awadeen et al., 2020). Asimismo, muchos de los trabajos previos generan un defecto

de espesor parcial, sin que exista una separación total de ambos fragmentos mandibulares, como ocurre en el defecto de gran tamaño generado en esta Tesis Doctoral. A este respecto, es importante señalar que un elevado porcentaje de los defectos clínicamente relevantes que ocurren en la práctica clínica corresponden a defectos de gran tamaño y espesor total en los que el tratamiento supone un enorme reto terapéutico. Por este motivo, el desarrollo de modelos críticos de espesor total y gran tamaño, como el que se utilizó en la presente Tesis Doctoral, una de las primeras descripciones de este tipo de modelo, podría reproducir más fielmente la situación clínica a la que a menudo se enfrentan los cirujanos en la práctica diaria (traumatismos graves, tumores, defectos congénitos y otras afecciones graves). El estudio de este tipo de modelo de defecto óseo podría contribuir a desarrollar nuevas terapias capaces de aportar alternativas terapéuticas para estos pacientes.

Por último, se procedió al análisis de las muestras utilizando métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos para caracterizar el tejido formado a nivel del defecto crítico mandibular. De este modo, se comprobó que los núcleos de tejido óseo existentes a nivel del defecto mandibular presentaban niveles normales de mineralización determinada mediante la técnica de rojo alizarina, sobre todo cuando se utilizó el hueso artificial humano que contenía células. Junto a ello, se observó la presencia significativamente incrementada de tejido osteoide y de cartílago identificado mediante azul de toluidina en los animales tratados con el hueso artificial humano. La presencia de una matriz extracelular altamente positiva para azul de toluidina a nivel del defecto en los animales tratados con el hueso humano artificial podría ser sugerente de la presencia de hueso inmaduro en formación de tipo osteoide, tal como se demostró previamente (Villanueva et al., 1983).

Asimismo, estos núcleos de tejido óseo presentaban gran cantidad de fibras de colágeno en comparación con los controles negativos, aunque no alcanzaron los niveles

del hueso normal. En principio, estos resultados apoyan la idea de que el tratamiento del defecto utilizando un sustituto óseo de fibrina-agarosa podría contribuir a mejorar la regeneración ósea, aunque sin alcanzar los niveles del hueso normal. De hecho, las fibras de colágeno son un componente fundamental de la matriz inorgánica del hueso humano normal, y su presencia es necesaria para dotar al hueso de sus propiedades biomecánicas, aportando resistencia y elasticidad (Kolb and Bussard, 2019). Por ese motivo, es importante que el hueso mantenga una elevada cantidad de fibras de colágeno, y su pérdida se ha asociado a un mayor riesgo de fracturas (Panzaru et al., 2023; Yang et al., 2023). En nuestro caso, es probable que la menor cantidad de colágeno encontrada en los fragmentos óseos existentes a nivel del defecto mandibular pueda explicarse por el carácter aún inmaduro de estos tejidos, siendo posible que el hueso acabe madurando y diferenciándose por completo tras un periodo de tiempo más prolongado. En este sentido, es bien sabido que el hueso inmaduro puede presentar inicialmente concentraciones variables de componentes minerales y no minerales (Wawrzyniak and Balawender, 2022).

En cuanto a los proteoglicanos identificados mediante azul alcán, los análisis cuantitativos mostraron muy escasa presencia de estos componentes en todos los tejidos formados a nivel del defecto óseo, sin diferencias respecto al control negativo. De nuevo, estos resultados son sugerentes de inmadurez del tejido formado a nivel del defecto, y podríamos hipotetizar que un mayor tiempo de evolución podría asociarse a una mayor síntesis de este tipo de componentes.

Por otro lado, se analizó la presencia de dos componentes fundamentales de la matriz ósea, la osteocalcina y el versicán, utilizando métodos inmunohistoquímicos. En ambos casos, se demostró que los fragmentos de hueso generados a nivel del defecto mandibular presentaban niveles normales de estos componentes, siendo comparables o incluso superiores a los niveles encontrados en el hueso normal utilizado como

control, sobre todo cuando se usó un sustituto óseo completo constituido por células humanas y biomateriales. Considerado como el principal marcador de actividad osteoblástica (Huang et al., 2007), la presencia de osteocalcina sugiere que la actividad de los osteocitos encontrados en los fragmentos óseos de la zona regenerativa presentaba actividad metabólica osteoblástica y, por tanto, podrían mostrar actividad regenerativa a nivel óseo. El hecho de que la osteocalcina resultó positiva especialmente cuando se usó un hueso artificial humano que contenía células podría estar en relación con la presencia de células inducidas hacia la estirpe osteogénica en el propio tejido artificial y apoya el uso de sustitutos óseos completos que contenían células diferenciadas hacia la estirpe osteogénica.

En relación al versicán, esta molécula de la matriz extracelular ósea juega un importante papel regulando la proliferación, migración y supervivencia celular (Wight, 2017), así como controlando la fisiología de la matriz extracelular interaccionando con las fibras de colágeno y otros componentes de dicha matriz (Grover and Roughley, 1993; Watanabe, 2022), y es un importante regulador del sistema inmune (Wight et al., 2020). El hecho de que los niveles de versicán resultaron comparables a los del hueso normal utilizado como control cuando se usó un sustituto óseo generado por ingeniería tisular sugiere que el desarrollo de este componente de la matriz extracelular ocurre de forma temprana y, probablemente, actúa como inductor para la formación de otros componentes. De hecho, estudios previos demostraron la interacción entre los diferentes componentes de la matriz extracelular, los cuales actúan de forma coordinada para lograr la correcta homeostasis tisular (Malta et al., 2023).

En general, estos resultados sugieren que el implante de un hueso artificial humano nanoestructurado de fibrina-agarosa podría contribuir a mejorar la regeneración ósea en un modelo de defecto óseo mandibular crítico de gran tamaño, aunque los resultados no lograron la restauración *ad integrum* del defecto creado a nivel

mandibular. Al tratarse de defectos óseos de gran tamaño para los que el tratamiento actualmente disponible ofrece muy pobres resultados, la terapia propuesta en esta Tesis Doctoral podría mejorar los resultados del tratamiento en pacientes afectados de graves patologías mandibulares. Sin embargo, aún se requiere seguir investigando en este sentido para mejorar los resultados obtenidos en este trabajo. Por un lado, como ya se discutió más arriba, se hace necesario realizar estudios a más largo plazo para determinar los niveles de regeneración ósea a tiempos más largos que los que se utilizaron en el presente estudio. A este respecto, diversos estudios desarrollados *in vivo* demostraron que los tejidos implantados van madurando progresivamente con el tiempo de evolución, y muchos de estos tejidos requieren incluso varios años de seguimiento en animales de experimentación (Garzón et al., 2020). Por otro lado, sería necesario desarrollar nuevos biomateriales y nuevos protocolos de diferenciación celular que permitan generar sustitutos del hueso humano plenamente funcionales y biomiméticos respecto al hueso humano normal. A este respecto, estudios previos demostraron la posibilidad de mejorar los sustitutos tisulares de fibrina-agarosa mediante la combinación con diferentes tipos de nanopartículas magnéticas (Lopez-Lopez et al., 2015; Gila-Vilchez et al., 2019; Campos et al., 2021), factores de crecimiento (Chato-Astrain et al., 2021) o incluso antibióticos (Chato-Astrain et al., 2020). Asimismo, la generación de sustitutos óseos multicapa que asocien al tejido óseo artificial una capa equivalente al periostio, tal como se hizo con otras estructuras multicapa (Martín-Piedra et al., 2017b).

En suma, el presente estudio es una de las primeras descripciones de un modelo animal de defecto óseo mandibular severamente crítico que podrá ser utilizado en el futuro para el desarrollo de terapias para este tipo de defectos. Junto a ello, se ha descrito un nuevo modelo de sustituto óseo humano que mostró utilidad potencial a la hora de mejorar la regeneración ósea, al menos, de forma parcial.

# CONCLUSIONES

## 6 CONCLUSIONES

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

1. La utilización de métodos de diferenciación celular en cultivo y de biomateriales de fibrina-agarosa sometidos a métodos de biofabricación avanzada, permitió desarrollar un nuevo modelo de hueso humano artificial nanoestructurado que contenía células diferenciadas hacia la estirpe osteogénica, así como sustitutos acelulares.

2. El análisis histológico del sustituto de hueso humano artificial nanoestructurado reveló la presencia de una densa estructura fibrilar que contenía células elongadas en su interior y presentaba analogía parcial con el tejido óseo humano. Aunque estas células mostraron positividad parcial para el marcador de mineralización rojo alizarina, resultaron negativas para osteocalcina. El análisis de las propiedades biomecánicas de este hueso artificial permitió determinar parámetros reológicos de esta estructura para su futuro uso como producto de terapias avanzadas.

3. El análisis de biocompatibilidad *in vivo* del hueso artificial humano de fibrina-agarosa implantado en un modelo animal de defecto óseo mandibular crítico de gran tamaño demostró la capacidad del tejido artificial para integrarse en el animal receptor sin que se apreciara ninguna reacción local sugerente de rechazo, infección, inflamación, malignización u otro tipo de efecto secundario a nivel macro o microscópico, lo cual avala la biocompatibilidad del modelo.

4. El estudio de funcionalidad del modelo de hueso artificial humano de fibrina-agarosa desarrollado en la presente Tesis Doctoral, demostró la utilidad de este tejido artificial para mejorar la regeneración ósea mandibular en defectos críticos de gran tamaño. La aplicación del hueso artificial humano logró mejorar la morfología y la simetría del macizo craneofacial en los animales intervenidos, disminuyendo asimismo

la aparición de defectos dentales. Los análisis correspondientes a la zona del defecto óseo mandibular revelaron una reducción del tamaño del defecto una vez culminado el tiempo de seguimiento establecido, existiendo diferencias significativas respecto a los controles negativos, especialmente en aquellos animales en los que se implantó un hueso artificial humano compuesto por células y biomateriales y, en menor medida, cuando se implantó un sustituto acelular.

5. La caracterización radiológica del defecto óseo mandibular, una vez culminado el tiempo de seguimiento, mostró la menor densidad radiológica del tejido regenerado a nivel del defecto, aunque la aplicación del sustituto óseo compuesto por células y biomateriales logró un aumento significativo de radiodensidad a nivel local. A nivel histológico, los resultados mostraron la presencia de núcleos de tejido óseo a nivel del defecto, cuando se usó un sustituto óseo y cuando se utilizó un sustituto acelular, y de zonas de tejido cartilaginoso en el grupo de hueso artificial humano compuesto por células y biomateriales. Los análisis histoquímicos e inmunohistoquímicos de la zona del defecto mostraron un aumento significativo de intensidad de tinción para rojo alizarina, sobre todo en los casos en los que se implantó un sustituto óseo con células, lo cual sugiere la presencia de actividad mineralizadora a este nivel. La utilización del sustituto óseo compuesto por células y biomateriales se asoció a un aumento significativo de tinción mediante azul de toluidina que podría sugerir la presencia de tejido osteoide. Asimismo, el implante de un sustituto acelular y, especialmente de un hueso artificial, se asoció a un aumento de actividad osteoblástica demostrada por inmunotinción para osteocalcina. Finalmente, el tejido óseo formado a nivel del defecto mandibular presentó un incremento significativo de la síntesis de fibras de colágeno y de versicán, aunque no de proteoglicanos identificados mediante la tinción de azul alcian. En general, estos resultados sugieren que los fragmentos de tejido óseo generados a nivel local presentan un gran número de componentes del tejido óseo humano normal, aunque con menores niveles de algunos componentes fibrilares y no fibrilares de la

matriz extracelular que sugieren un estado de diferenciación aún incipiente y la presencia de un hueso inmaduro.

6. En conjunto, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral sugieren que los sustitutos óseos nanoestructurados generados por ingeniería tisular, especialmente en el caso de los sustitutos celulares, podrían ser útiles para el tratamiento de defectos críticos del hueso mandibular en un modelo animal de defecto óseo crítico de gran tamaño, contribuyendo a un mejor desarrollo morfo-funcional e histológico y a la regeneración parcial del hueso mandibular. Estos resultados abren la puerta al futuro uso de estos sustitutos para el tratamiento de pacientes con grandes defectos del hueso mandibular.

# ABREVIATURAS

## 7 ABREVIATURAS

### ABREVIATURAS

IT: Ingeniería Tisular

ITO: Ingeniería Tisular Ósea

ONMRM: osteonecrosis mandibular relacionada con medicamentos

FLP: fisura labio-palatina

SAS: sistema andaluz de salud

CME: células madre embrionarias

MSC: células madre adultas, mesenquimales o multipotentes

BMSC: células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea

ADSC: células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo

DPSC: células madre mesenquimales derivadas de la pulpa dental

PDLSC: células madre derivadas del ligamento periodontal SHED: células madre derivadas de dientes temporales iPSC: células madre de pluripotencialidad inducida SVF: fracción estromal vascular

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular

MEC: matriz extracelular

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Farmacéuticos ()

# BIBLIOGRAFÍA

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, C. M., y Ray, R. B. (2001). Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* 55(2):141-150. doi:10.1002/1097-4636(200105)55:2<141::aid-jbm1000>3.0.co;2-j.
- Al-Ruwaithi, M., Al-Shehri, A., Al-Tamimi, T., y Al-Fraidi, A. (2014). Interdisciplinary treatment of an adult with a unilateral cleft lip and palate. *J. Orthod. Sci.* 3(1):17. doi:10.4103/2278-0203.127555.
- Alaminos, M., Garzón, I., Sánchez-Quevedo, M. C., Moreu, G., González-Andrades, M., Fernández-Montoya, A., et al. (2007). Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1(5):350-359. doi:10.1002/TERM.38.
- Alaminos, M., Sánchez-Quevedo, M. D. C., Muñoz-Ávila, J. I., Serrano, D., Medialdea, S., Carreras, I., et al. (2006). Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47(8):3311-3317. doi:10.1167/IOVS.05-1647.
- Albrektsson, T., y Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.* 10 Suppl 2(Suppl 2):S96-101. doi:10.1007/s005860100282.
- Alfonso-Rodríguez, C. A., Garzón, I., Garrido-Gómez, J., Oliveira, A. C. X., Martín-Piedra, M. Á., Scionti, G., et al. (2014). Identification of histological patterns in clinically affected and unaffected palm regions in dupuytren's disease. *PLoS One* 9(11) doi:10.1371/journal.pone.0112457.
- Almela Rojo, M., y Iniesta Turpin, J. (2015). «Anatomía quirúrgica de las regiones cérvico-

faciales.», en *Libro Virtual de Formación en Otorrino-Laringología* (Murcia), 1-14. Available at: [https://seorl.net/PDF/cabeza cuello y plastica/121 - EMBRIOLOGÍA, ANATOMÍA TOPOGRÁFICA Y ANATOMÍA QUIRÚRGICA DE LAS REGIONES CÉRVICO-FACIALES.pdf?boxtype=pdf&g=false&s=false&s2=false&r=wide](https://seorl.net/PDF/cabeza%20cuello%20y%20plastica/121%20-%20EMBRIOLOGÍA,%20ANATOMÍA%20TOPOGRÁFICA%20Y%20ANATOMÍA%20QUIRÚRGICA%20DE%20LAS%20REGIONES%20CÉRVICO-FACIALES.pdf?boxtype=pdf&g=false&s=false&s2=false&r=wide).

Arthur, A., Zannettino, A., y Gronthos, S. (2009). The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J. Cell. Physiol.* 218(2):237-245. doi:10.1002/jcp.21592.

Awadeen, M. A., Al-Belasy, F. A., Ameen, L. E., Helal, M. E., y Grawish, M. E. (2020). Early therapeutic effect of platelet-rich fibrin combined with allogeneic bone marrow-derived stem cells on rats' critical-sized mandibular defects. *World J. Stem Cells* 12(1):55-69. doi:10.4252/WJSC.V12.I1.55.

Bai, Y., Niu, Y., Qin, S., y Ma, G. (2023). A New Biomaterial Derived from Aloe vera-Acemannan from Basic Studies to Clinical Application. *Pharmaceutics* 15(7) doi:10.3390/pharmaceutics15071913.

Basyuni, S., Ferro, A., Santhanam, V., Birch, M., y McCaskie, A. (2020). Systematic scoping review of mandibular bone tissue engineering. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 58(6):632-642. doi:10.1016/j.bjoms.2020.03.016.

Becerra, J., Andrades, J. A., Santamaría, J. A., Cifuentes, M., y Guerado, E. (2001). [Bone regeneration, cell therapy and tissue engineering]. *Med. Clin. (Barc)*. 116(1):23-34. doi:10.1016/s0025-7753(01)71706-x.

Bernardi, S., Macchiarelli, G., y Bianchi, S. (2020). Autologous materials in regenerative dentistry: Harvested bone, platelet concentrates and dentin derivatives. *Molecules* 25(22) doi:10.3390/molecules25225330.

Bertelè, G., Mercanti, M., Stella, F., Albanese, M., y De Santis, D. (2005). Osteodistraction

in the craniofacial region. *Minerva Stomatol.* 54(4):179-198.

- Blanco-Elices, C., Chato-Astrain, J., Oyonarte, S., Bermejo-Casares, F., España-López, A., Fernández-Valadés, R., et al. (2021). Generation of a novel model of bioengineered human oral mucosa with increased vascularization potential. *J. Periodontal Res.* 56(6):1116-1131. doi:10.1111/jre.12927.
- Bonassar, L. J., y Vacanti, C. A. (1998). Tissue engineering: The first decade and beyond. *J. Cell. Biochem.* 72 Suppl 3(S30-31):297-303. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(1998)72:30/31+<297::AID-JCB36>3.0.CO;2-6.
- Bosch-Rué, È., Díez-Tercero, L., Buitrago, J. O., Castro, E., y Pérez, R. A. (2023). Angiogenic and immunomodulation role of ions for initial stages of bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 166:14-41. doi:10.1016/J.ACTBIO.2023.06.001.
- Boyne, P. J. (1996). Animal studies of application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. *Bone* 19(1 Suppl):83S-92S. doi:10.1016/s8756-3282(96)00144-5.
- Burg, K. J., Porter, S., y Kellam, J. F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21(23):2347-2359. doi:10.1016/s0142-9612(00)00102-2.
- Cagigal, B. P., González, L. M. R., Hernández, A. V., Soto, A. S., Nieto, M. Á. T., y Puerta, C. V. (2008). Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. *Rev. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.* 30(5):313-323. doi:10.4321/s1130-05582008000500002.
- Campos, F., Bonhome-Espinosa, A. B., Vizcaino, G., Rodriguez, I. A., Duran-Herrera, D., López-López, M. T., et al. (2018). Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models for tissue engineering applications. *Biomed. Mater.* 13(2) doi:10.1088/1748-605X/AA9AD2.
- Canceill, T., Jourdan, G., Kémoun, P., Guissard, C., Monsef, Y. A., Bourdens, M., et al.

- (2023). Characterization and Safety Profile of a New Combined Advanced Therapeutic Medical Product Platelet Lysate-Based Fibrin Hydrogel for Mesenchymal Stromal Cell Local Delivery in Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 24(3) doi:10.3390/IJMS24032206.
- Carr, M. M., Freiberg, A., y Martin, R. D. (1994). Facial fractures. *Can. Fam. Physician* 40.
- Carriel, V., Garrido-Gómez, J., Hernández-Cortés, P., Garzón, I., García-García, S., Sáez-Moreno, J. A., et al. (2013). Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *J. Neural Eng.* 10(2) doi:10.1088/1741-2560/10/2/026022.
- Carriel, V., Garzón, I., Jiménez, J. M., Oliveira, A. C. X., Arias-Santiago, S., Campos, A., et al. (2012). Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs* 196(1):1-12. doi:10.1159/000330682.
- Carriel, V., Scionti, G., Campos, F., Roda, O., Castro, B., Cornelissen, M., et al. (2017). In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11(5):1412-1426. doi:10.1002/term.2039.
- Castro, B. (2013). Aplicaciones clínicas de las células madre del tejido adiposo. *Cir. Plast. Ibero-Latinoamericana* 39(SUPPL. 1) doi:10.4321/S0376-78922013000500009.
- Chato-Astrain, J., Campos, F., Roda, O., Miralles, E., Durand-Herrera, D., Sáez-Moreno, J. A., et al. (2018). In vivo evaluation of nanostructured fibrin-agarose hydrogels with mesenchymal stem cells for peripheral nerve repair. *Front. Cell. Neurosci.* 12:501. doi:10.3389/fncel.2018.00501.
- Chato-Astrain, J., Chato-Astrain, I., Sánchez-Porras, D., García-García, Ó. D., Bermejo-

- Casares, F., Vairo, C., et al. (2020). Generation of a novel human dermal substitute functionalized with antibiotic-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) with antimicrobial properties for tissue engineering. *J. Nanobiotechnology* 18(1) doi:10.1186/S12951-020-00732-0.
- Chopra, K., Folstein, M. K., Manson, P. N., y Gastman, B. R. (2014). Complex craniofacial reconstruction using stereolithographic modeling. *Ann. Plast. Surg.* 72(1):59-63. doi:10.1097/SAP.0b013e3182583f00.
- Cifuentes, L. (2018). Secuencia de Pierre Robin: implicación de la fisura palatina en la distracción mandibular. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana* 44(3):281-286. doi:10.4321/s0376-78922018000300008.
- Dalfino, S., Savadori, P., Piazzoni, M., Connelly, S. T., Gianni, A. B., Del Fabbro, M., et al. (2023). Regeneration of Critical-Sized Mandibular Defects Using 3D-Printed Composite Scaffolds: A Quantitative Evaluation of New Bone Formation in In Vivo Studies. *Adv. Healthc. Mater.* 12(21) doi:10.1002/adhm.202300128.
- De La Cruz Cardona, J., Ionescu, A. M., Gómez-Sotomayor, R., González-Andrades, M., Campos, A., Alaminos, M., et al. (2011). Transparency in a fibrin and fibrin-agarose corneal stroma substitute generated by tissue engineering. *Cornea* 30(12):1428-1435. doi:10.1097/ICO.0b013e31821bdfd4.
- De la Peña-Brambila, F., y Miranda-Díaz, A. (2016). Alternativas de reconstrucción de los defectos óseos mandibulares. *Rev. Mex. Cirugía Bucal y Maxilofac.* 12(3):99-106.
- De Ugarte, D. A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., et al. (2003). Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol. Lett.* 89(2-3):267-270. doi:10.1016/S0165-2478(03)00108-1.

- Dealler, S. F. (1981). Electrical phenomena associated with bones and fractures and the therapeutic use of electricity in fracture healing. *J. Med. Eng. Technol.* 5(2):73-79. doi:10.3109/03091908109042442.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905.
- Egea-Guerrero, J. J., Carmona, G., Correa, E., Mata, R., Arias-Santiago, S., Alaminos, M., et al. (2019). Transplant of Tissue-Engineered Artificial Autologous Human Skin in Andalusia: An Example of Coordination and Institutional Collaboration. *Transplant. Proc.* 51(9):3047-3050. doi:10.1016/j.transproceed.2019.08.014.
- Einhorn, T. A. (1998). The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (355 Suppl):S7-21. doi:10.1097/00003086-199810001-00003.
- El-Ghannam, A. R. (2004). Advanced bioceramic composite for bone tissue engineering: design principles and structure-bioactivity relationship. *J. Biomed. Mater. Res. A* 69(3):490-501. doi:10.1002/jbm.a.30022.
- Ernesto, J., Villasana, M., Pérez, H. B., y Cervantes, E. M. (2012). Efectividad del modelo estereolitográfico en cirugía predictiva craneomaxilofacial en el Hospital Regional «General Ignacio Zaragoza» del ISSSTE. *Rev. Espec. Médico-Quirúrgicas* 17(1):34-38.
- Fernández-Valadés-Gámez, R., Garzón, I., Liceras-Liceras, E., España-López, A., Carriel, V., Martín-Piedra, M. Á., et al. (2016). Usefulness of a bioengineered oral mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiosteal defect. *Biomed. Mater.* 11(1):15015. doi:10.1088/1748-6041/11/1/015015.

- Fernández M, E., Padilla A, P., Reyes, C., y Lisboa, D. (2018). Osteonecrosis mandibular relacionada con medicamentos: conceptos teóricos y prácticos actuales para el odontólogo general. *Odontol. Vital* 29(2):19-32. Available at: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/odov/n29/1659-0775-odov-29-19.pdf>.
- Gallea, S., Lallemand, F., Atfi, A., Rawadi, G., Ramez, V., Spinella-Jaegle, S., et al. (2001). Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone* 28(5):491-498. doi:10.1016/s8756-3282(01)00415-x.
- Gallego, L., Junquera, L., García, E., García, V., Alvarez-Viejo, M., Costilla, S., et al. (2010). Repair of rat mandibular bone defects by alveolar osteoblasts in a novel plasma-derived albumin scaffold. *Tissue Eng. Part A* 16(4):1179-1187. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0517.
- García-Martínez, L., Campos, F., Godoy-Guzmán, C., del Carmen Sánchez-Quevedo, M., Garzón, I., Alaminos, M., et al. (2017). Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels. *Histochem. Cell Biol.* 147(1):83-95. doi:10.1007/s00418-016-1485-9.
- Garzón, I., Miyake, J., González-Andrades, M., Carmona, R., Carda, C., Sánchez-Quevedo, M. del C., et al. (2013). Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem Cells Transl. Med.* 2(8):625-32. doi:10.5966/sctm.2012-0157.
- Garzón, I., Serrato, D., Roda, O., Del Carmen Sánchez-Quevedo, M., González-Jaranay, M., Moreu, G., et al. (2009). In vitro Cytokeratin Expression Profiling of Human Oral Mucosa Substitutes Developed by Tissue Engineering. *Int. J. Artif. Organs* 32(10):711-719. doi:10.1177/039139880903201002.
- Gehrke, S. A., Díaz, G. P., Rigo, E. C. da S., y Carbonari, M. (2007). Obtención de

hidroxiapatita para injerto óseo por el método de precipitación. *Actas Odontológicas* IV(2):41-48.

Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., y Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: an update. *Injury* 36 Suppl 3:20-27. doi:10.1016/j.injury.2005.07.029.

Gil, J. M., Palau, E. M., y Ramos Macías, Á. (2002). Libro virtual de formación en ORL III. CAVIDAD ORAL Y FARINGE. (Tomo I):1-18.

Gironés Camarasa, B., García Dueñas, C., Castilla Parrilla, E., Licerias Licerias, E., Mátar Sattuf, K., España López, A., et al. (2018). Adherencia al tratamiento de moldeado nasoalveolar en pacientes con fisura labiopalatina. *Cir. Pediatr.* 31(4):182-186.

González-Andrades, M., Garzón, I., Gascón, M. I., Muñoz-Ávila, J. I., Sánchez-Quevedo, M. C., Campos, A., et al. (2009). Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3(6):442-449. doi:10.1002/TERM.178.

González-Gallardo, C., Martínez-Atienza, J., Mataix, B., Muñoz-Ávila, J. I., Daniel Martínez-Rodríguez, J., Medialdea, S., et al. (2023). Successful restoration of corneal surface integrity with a tissue-engineered allogeneic implant in severe keratitis patients. *Biomed. Pharmacother.* 162 doi:10.1016/J.BIOPHA.2023.114612.

Graves, D. T., Li, J., y Cochran, D. L. (2011). Critical review in oral biology & medicine: Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J. Dent. Res.* 90(2):143-153. doi:10.1177/0022034510385236.

Gundle, R., Joyner, C. J., y Triffitt, J. T. (1995). Human bone tissue formation in diffusion chamber culture in vivo by bone-derived cells and marrow stromal fibroblastic cells. *Bone* 16(6):597-601. doi:10.1016/8756-3282(95)00112-q.

Gurdon, J. B., Byrne, J. A., y Simonsson, S. (2003). Nuclear reprogramming and stem cell

- creation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(suppl 1):11819 LP - 11822. doi:10.1073/pnas.1834207100.
- Hadlock, T. A., Vacanti, J. P., y Cheney, M. L. (1998). Tissue engineering in facial plastic and reconstructive surgery. *Facial Plast. Surg.* 14(3):197-203. doi:10.1055/s-2008-1064345.
- Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M., y Caplan, A. I. (1992). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13(1):81-88. doi:10.1016/8756-3282(92)90364-3.
- Herford, A. S., y Boyne, P. J. (2008). Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J. oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 66(4):616-624. doi:10.1016/j.joms.2007.11.021.
- Higeuchi, M., Namaki, S., Furukawa, A., y Yonehara, Y. (2023). Radiological and histochemical study of bone regeneration using the costal cartilage in rats. *J. Oral Sci.* 65(2):90-95. doi:10.2334/JOSNUSD.22-0447.
- Huh, J.-Y., Choi, B.-H., Kim, B.-Y., Lee, S.-H., Zhu, S.-J., y Jung, J.-H. (2005). Critical size defect in the canine mandible. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 100(3):296-301. doi:10.1016/j.tripleo.2004.12.015.
- Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21(24):2529-2543. doi:10.1016/s0142-9612(00)00121-6.
- Illich, D. J., Demir, N., Stojković, M., Scheer, M., Rothamel, D., Neugebauer, J., et al. (2011). Concise review: induced pluripotent stem cells and lineage reprogramming: prospects for bone regeneration. *Stem Cells* 29(4):555-563. doi:10.1002/stem.611.
- Infante Contreras, C. (2009). «Mandíbula», en *Fundamentos para la evaluación del crecimiento, desarrollo y función craneofacial*. Universidad Nacional de Colombia.

- Ionescu, A. M., De La Cruz Cardona, J., González-Andrades, M., Alaminos, M., Campos, A., Hita, E., et al. (2010). UV absorbance of a bioengineered corneal stroma substitute in the 240-400 nm range. *Cornea* 29(8):895-898. doi:10.1097/ICO.0b013e3181ca3650.
- Jadlowiec, J. A., Celil, A. B., y Hollinger, J. O. (2003). Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert Opin. Biol. Ther.* 3(3):409-423. doi:10.1517/14712598.3.3.409.
- Jiang, X., Zou, S., Ye, B., Zhu, S., Liu, Y., y Hu, J. (2010). bFGF-Modified BMMSCs enhance bone regeneration following distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 46(4):1156-1161. doi:10.1016/j.bone.2009.12.017.
- Jockenhoevel, S., Zund, G., Hoerstrup, S. P., Chalabi, K., Sachweh, J. S., Demircan, L., et al. (2001). Fibrin gel -- advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur. J. cardio-thoracic Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-thoracic Surg.* 19(4):424-430. doi:10.1016/s1010-7940(01)00624-8.
- Kaban, L. B., y Glowacki, J. (1981). Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. *J. Dent. Res.* 60(7):1356-1364. doi:10.1177/00220345810600071201.
- Kaban, L. B., Glowacki, J., y Murray, J. E. (1979). Repair of experimental mandibular bony defects in rats. *Surg. Forum* 30:519-521.
- Kessler, P., Kloss, F., Hirschfelder, U., Neukam, F. W., y Wiltfang, J. (2003). [Distraction osteogenesis in the midface. Indications, technique and first long-term results]. *Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin = Rev. Mens. suisse d'odontostomatologie = Riv. Mens. Svizz. di Odontol. e Stomatol.* 113(6):677-692.
- Ku, J. K., Ghim, M. S., Park, J. H., y Leem, D. H. (2023). A ramus cortical bone harvesting

- technique without bone marrow invasion. *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* 49(2):100-104. doi:10.5125/JKAOMS.2023.49.2.100.
- Langer, R., y Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science* 260(5110):920-926. doi:10.1126/science.8493529.
- Leong, K. F., Cheah, C. M., y Chua, C. K. (2003). Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* 24(13):2363-2378. doi:10.1016/s0142-9612(03)00030-9.
- Li, H., Wang, X., Chen, E., Liu, X., Ma, X., Miao, C., et al. (2022). Introduction of a Cys360Tyr Mutation in ANO5 Creates a Mouse Model for Gnathodiaphyseal Dysplasia. *J. Bone Miner. Res.* 37(3):515-530. doi:10.1002/jbmr.4481.
- Liceras-Liceras, E., Garzón, I., España-López, A., Oliveira, A. C. X., García-Gómez, M., Martín-Piedra, M.-Á., et al. (2017). Generation of a bioengineered autologous bone substitute for palate repair: an in vivo study in laboratory animals. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11(6):1907-1914. doi:10.1002/term.2088.
- Lind, M., y Bünger, C. (2001). Factors stimulating bone formation. *Eur. spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.* 10 Suppl 2(Suppl 2):S102-9. doi:10.1007/s005860100269.
- Liu, S., He, S., Chen, C., Li, C., Luo, W., Zheng, K., et al. (2023). A Versatile Disorder-to-Order Technology to Upgrade Polymers into High-Performance Bioinspired Materials. *Adv. Healthc. Mater.* 12(22) doi:10.1002/adhm.202300068.
- Mardones, M., Fernandez, M., Bravo, R., Pedemonte, C., y Ulloa, C. (2011). Traumatología Máxilo Facial: Diagnóstico Y Tratamiento. *Rev. Med. Clin. Condes* 22(5):607-616. Available at: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-677265>.

- Marei, H. F., Mahmood, K., y Almas, K. (2018). Critical size defects for bone regeneration experiments in the dog mandible: A systematic review. *Implant Dent.* 27(1):135-141. doi:10.1097/ID.0000000000000713.
- Marler, J., Upton, J., Langer, R., y Vacanti, J. (1998). Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 33(1-2):165-182. doi:10.1016/s0169-409x(98)00025-8.
- Martín-masot, R., Osorio-cámara, J. M., Martínez-plaza, A., y Robin, S. P. (2017). Cirugía Oral y Maxilofacial Distracción mandibular ósea : resultados del postoperatorio inmediato. 0(1):1-6.
- Martín-Piedra, M. A., Alaminos, M., Fernández-Valadés-Gámez, R., España-López, A., Licerias-Licerias, E., Sánchez-Montesinos, I., et al. (2017). Development of a multilayered palate substitute in rabbits: a histochemical ex vivo and in vivo analysis. *Histochem. Cell Biol.* 147(3):377-388. doi:10.1007/s00418-016-1489-5.
- Meghil, M. M., Mandil, O., Nevins, M., Saleh, M. H. A., y Wang, H. L. (2023). Histologic Evidence of Oral and Periodontal Regeneration Using Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor. *Med.* 59(4) doi:10.3390/medicina59040676.
- Mercado Montañez, F. (2017). Tumores mandibulares de conducta agresiva en pacientes pediátricos reconstruidos con placas de titanio (reporte de 3 casos). *Rev. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.* 39(3):150-155. doi:10.1016/j.maxilo.2016.05.003.
- Meruane, M., Smok, C., y Rojas, M. (2012). Desarrollo de Cara y Cuello en Vertebrados. *Int. J. Morphol.* 30(4):1373-1388. doi:10.4067/s0717-95022012000400020.
- Migliorini, F., La Padula, G., Torsiello, E., Spiezia, F., Oliva, F., y Maffulli, N. (2021). Strategies for large bone defect reconstruction after trauma, infections or tumour excision: a comprehensive review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* 26(1)

doi:10.1186/s40001-021-00593-9.

Miloro, M., Ghali, G., Larsen, P., y Waite, P. (2004). *Peterson's principles of oral and maxillofacial surgery.* , ed. B. Decker Hamilton, Ont.; London: B C Decker.

Mol, A., van Lieshout, M. I., Dam-de Veen, C. G., Neuenschwander, S., Hoerstrup, S. P., Baaijens, F. P. T., et al. (2005). Fibrin as a cell carrier in cardiovascular tissue engineering applications. *Biomaterials* 26(16):3113-3121. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.08.007.

Mudera, V., Morgan, M., Cheema, U., Nazhat, S., y Brown, R. (2007). Ultra-rapid engineered collagen constructs tested in an in vivo nursery site. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1(3):192-198. doi:10.1002/term.25.

Murcia-ordo, G. A. P. B. (2017). *P* Erinatología. 31(1):28-33.

Nasir, N. J. N., Arifin, N., Noordin, K. B. A. A., y Yusop, N. (2023). Bone repair and key signalling pathways for cell-based bone regenerative therapy: A review. *J. Taibah Univ. Med. Sci.* 18(6):1350-1363. doi:10.1016/j.jtumed.2023.05.015.

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

Oliver, J. D., Madhoun, W., Graham, E. M., Hendrycks, R., Renouard, M., y Hu, M. S. (2020). Stem Cells Regenerating the Craniofacial Skeleton : Current State-Of-The-Art and Future Directions. *J. Clin. Med.* 9(10):3307. doi:10.3390/jmc9103307.

Orive, G., Hernández, R., Garcón, A., Igartúa, M., y Pedráz, J. (2003). Ingeniería Tisular: Retos y realidades. *Vitae, Rev. la Fac. química Farm.* Volumen 10(2):46-51. Available at: <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169817981005.pdf>.

- Paré, A., Charbonnier, B., Veziere, J., Vignes, C., Dutilleul, M., De Pinieux, G., et al. (2022). Standardized and axially vascularized calcium phosphate-based implants for segmental mandibular defects: A promising proof of concept. *Acta Biomater.* 154:626-640. doi:10.1016/j.actbio.2022.09.071.
- Patel, M., y Fisher, J. P. (2008). Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering. *Pediatr. Res.* 63(5):497-501. doi:10.1203/01.PDR.0b013e318165eb3e.
- Peñaloza Salazar, J., y Rodríguez Ramírez, J. (2019). Morfogénesis maxilo-mandibular. *Acad. Biomed. Digit.* 77:1-6. Available at: [https://vitae.ucv.ve/index\\_pdf.php?module=articulo\\_pdf&n=5967&rv=142](https://vitae.ucv.ve/index_pdf.php?module=articulo_pdf&n=5967&rv=142).
- Pogrel, M. A., Podlesh, S., Anthony, J. P., y Alexander, J. (1997). A comparison of vascularized and nonvascularized bone grafts for reconstruction of mandibular continuity defects. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 55(11):1200-1206. doi:10.1016/S0278-2391(97)90165-8.
- Polak, J. M., y Bishop, A. E. (2006). Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1068:352-366. doi:10.1196/annals.1346.001.
- Prada-Madrid, R. (2018). Modelos de impresión tridimensional en la planificación preoperatoria y en la enseñanza académica de las fracturas mandibulares. *Cir. Plast. Ibero-Latinoamericana* 44(2):201. doi:10.4321/s0376-78922018000200013.
- Qin, K., Yu, M., Fan, J., Wang, H., Zhao, P., Zhao, G., et al. (2023). Canonical and noncanonical Wnt signaling: Multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk. *Genes Dis.* 11(1) doi:10.1016/j.gendis.2023.01.030.
- Ramzan, F., Salim, A., y Khan, I. (2023). Osteochondral Tissue Engineering Dilemma: Scaffolding Trends in Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev. Reports* 19(6):1615-1634. doi:10.1007/s12015-023-10545-x.

- Rao, D., Weyh, A., Bunnell, A., y Hernandez, M. (2023). The Role of Imaging in Mandibular Reconstruction with Microvascular Surgery. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.* 35(3):327-344. doi:10.1016/j.coms.2023.01.002.
- Rico-Sánchez, L., Garzón, I., González-Andrades, M., Ruíz-García, A., Punzano, M., Lizana-Moreno, A., et al. (2019). Successful development and clinical translation of a novel anterior lamellar artificial cornea. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 13(12):2142-2154. doi:10.1002/term.2951.
- Rodríguez, Á. E., y Nowzari, Hessam (2020). Riesgos y complicaciones clínicas asociadas con los injertos de origen bovino. *Rev. la Asoc. Dent. Mex.* 77(2):108-116. doi:10.35366/93104.
- Rolstad, B. (2001). The athymic nude rat: an animal experimental model to reveal novel aspects of innate immune responses? *Immunol. Rev.* 184:136-144. doi:10.1034/J.1600-065X.2001.1840113.X.
- Sadler, T.W. (2012). *Langman. Embriología Medica*. 12.<sup>a</sup> ed. , eds. Lippincott, Williams, y Wilkins Barcelona.
- Salgado, A. J., Coutinho, O. P., y Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol. Biosci.* 4(8):743-765. doi:10.1002/mabi.200400026.
- Sánchez-Porras, D., Durand-Herrera, D., Paes, A. B., Chato-Astrain, J., Verplancke, R., Vanfleteren, J., et al. (2021). Ex Vivo Generation and Characterization of Human Hyaline and Elastic Cartilaginous Microtissues for Tissue Engineering Applications. doi:10.3390/biomedicines9030292.
- Schmitz, J. P., y Hollinger, J. O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (205):299-308.

- Scionti, G., Moral, M., Toledano, M., Osorio, R., Durán, J. D. G., Alaminos, M., et al. (2014). Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 102(8):2573-2582. doi:10.1002/jbm.a.34929.
- Selleri, L., y Rijli, F. M. (2023). Shaping faces: genetic and epigenetic control of craniofacial morphogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 24(9):610-626. doi:10.1038/s41576-023-00594-w.
- Shen, E. C., Chou, T. C., Gau, C. H., Tu, H. P., Chen, Y. T., y Fu, E. (2006). Releasing growth factors from activated human platelets after chitosan stimulation: A possible bio-material for platelet-rich plasma preparation. *Clin. Oral Implants Res.* 17(5):572-578. doi:10.1111/j.1600-0501.2004.01241.x.
- Solheim, E. (1998). Growth factors in bone. *Int. Orthop.* 22(6):410-416. doi:10.1007/s002640050290.
- Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Salagianni, M., Baxevanis, C. N., y Papamichail, M. (2006). Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24(2):462-471. doi:10.1634/stemcells.2004-0331.
- Streckbein, P., Jäckel, S., Malik, C. Y., Obert, M., Kähling, C., Wilbrand, J. F., et al. (2013). Reconstruction of critical-size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. *J. Cranio-Maxillofacial Surg.* 41(6):496-503. doi:10.1016/j.jcms.2013.04.002.
- Su, S. J., Chang, K. L., Su, S. H., Yeh, Y. T., Shyu, H. W., y Chen, K. M. (2013). Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 64(4):429-436. doi:10.3109/09637486.2012.759184.

- Takahashi, K., y Yamanaka, S. (2013). Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Dev.* 140(12):2457-2461. doi:10.1242/dev.092551.
- Torroni, A., Marianetti, T. M. atte., Romandini, M., Gasparini, G., Cervelli, D., y Pelo, S. (2015). Mandibular reconstruction with different techniques. *J. Craniofac. Surg.* 26(3):885-890. doi:10.1097/SCS.0000000000001411.
- Troeltzsch, M., Zeiter, S., Arens, D., Nehrbass, D., Probst, F. A., Liokatis, P., et al. (2023). Chronic Periodontal Infection and Not Iatrogenic Interference Is the Trigger of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: Insights from a Large Animal Study (PerioBRONJ Pig Model). *Med.* 59(5) doi:10.3390/medicina59051000.
- Tüz, H. H., Koç, O., Meral, S. E., y El, A. S. (2019). Reconstruction and Implant-Supported Rehabilitation of an Iatrogenically Caused Maxillary Alveolar Defect. *Implant Dent.* 28(5):510-513. doi:10.1097/ID.0000000000000910.
- Valenzuela Donoso, M. (1947). Osteomielitis de los maxilares. *Trib. Odontol. (B. Aires).* 31(5):154.
- Vela-Romera, A., Carriel, · V, Martín-Piedra, M. A., Aneiros-Fernández, · J, Campos, · F, Chato-Astrain, · J, et al. (2019). Characterization of the human ridged and non-ridged skin: a comprehensive histological, histochemical and immunohistochemical analysis. *Histochem. Cell Biol.* 151:57-73. doi:10.1007/s00418-018-1701-x.
- Verma, R., Kumar, S., Garg, P., y Verma, Y. K. (2023). Platelet-rich plasma: a comparative and economical therapy for wound healing and tissue regeneration. *Cell Tissue Bank.* 24(2):285-306. doi:10.1007/s10561-022-10039-z.
- Viñuela-Prieto, J. M., Sánchez-Quevedo, M. C., Alfonso-Rodríguez, C. A., Oliveira, A. C., Scionti, G., Martín-Piedra, M. A., et al. (2015). Sequential keratinocytic differentiation and maturation in a three-dimensional model of human artificial

oral mucosa. *J. Periodontal Res.* 50(5):658-665. doi:10.1111/jre.12247.

- Weinand, C., Gupta, R., Weinberg, E., Madisch, I., Jupiter, J. B., y Vacanti, J. P. (2007). Human shaped thumb bone tissue engineered by hydrogel-beta-tricalciumphosphate/poly-epsilon-caprolactone scaffolds and magnetically sorted stem cells. *Ann. Plast. Surg.* 59(1):46-52; discussion 52. doi:10.1097/01.sap.0000264887.30392.72.
- Yan, Y., Zhang, Z., Han, W., Sun, M., Kim, B. S., Zhang, Y., et al. (2023). Preliminary Application Research of 3D Bioprinting in Craniofacial Reconstruction. *J. Craniofac. Surg.* 34(2):805-808. doi:10.1097/SCS.00000000000009113.
- Yang, X., Jiang, J., Zhou, L., Wang, S., He, M., Luo, K., et al. (2019). Osteogenic and angiogenic characterization of mandible and femur osteoblasts. *J. Mol. Histol.* 50(2):105-117. doi:10.1007/s10735-019-09810-6.
- Zhu, H., Zheng, J., Oh, X. Y., Chan, C. Y., Low, B. Q. L., Tor, J. Q., et al. (2023). Nanoarchitecture-Integrated Hydrogel Systems toward Therapeutic Applications. *ACS Nano* 17(9):7953-7978. doi:10.1021/acsnano.2c12448.
- Zimmerlin, L., Donnenberg, V. S., Pfeifer, M. E., Meyer, E. M., Péault, B., Rubin, J. P., et al. (2010). Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry. A* 77(1):22-30. doi:10.1002/cyto.a.20813.