



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

AVANCES EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS PARA LA
REGENERACIÓN CRANEOFACIAL

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A :

THALÍA MARLENE CRUZ AYALA

TUTOR: Dr. GONZALO MONTOYA AYALA

MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. OBJETIVO.....	9
3. ANTECEDENTES.....	10
4. GENERALIDADES DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	11
4.1 CÉLULAS.....	13
4.1.1 CÉLULAS TRONCALES.....	21
4.1.2 iPS.....	25
4.2 MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN.....	27
4.2.1 FACTORES DE CRECIMIENTO.....	28
4.2.2 BMPs.....	31
4.2.3 PÉPTIDOS.....	32
4.2.4 INTERLUCINAS.....	34
4.3 MATRIZ EXTRACELULAR.....	36
4.3.1 INTEGRINAS.....	41
4.4 ANDAMIOS.....	43
4.4.1 ANDAMIOS PARA TEJIDOS BLANDOS.....	45
4.4.1.1 DERMIS ACELULAR HUMANA.....	45
4.4.1.2 DERMIS DESEPITELIZADA.....	46
4.4.1.3 MEMBRANA AMNIÓTICA.....	47
4.4.1.4 DE GELATINA.....	48
4.4.1.5 DE FIBRINA.....	50
4.4.1.6 SUSTITUTOS DE PIEL CON FIBROBLASTOS.....	51
4.4.1.7 POLÍMEROS.....	52
4.4.1.8 ÁCIDO GLICOLICOPOLILÁCTICO.....	54
4.4.2 ANDAMIOS PARA TEJIDOS DUROS.....	56

4.4.2.1	A BASE DE COLÁGENA.....	57
4.4.2.2	A BASE DE QUITOSANO.....	60
4.4.2.3	ALOPLÁSTICOS.....	63
4.4.2.4	BIOCERÁMICAS.....	63
5.	APLICACIONES DE LOS AVANCES DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	66
6.	CONCLUSIONES.....	70
7.	GLOSARIO.....	72
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

A la memoria de mi padre Juan Manuel

Agradecimientos

A Delia Rosa; mi madre, por su amor, apoyo, paciencia y confianza en cada paso que he dado, por brindarme todo ese esfuerzo y esa dedicación para llegar hasta aquí y por ese gran ejemplo de fortaleza y sabiduría para llevar la vida.

A Manuel; mi hermano, amigo y compañero de vida, por ser esa pieza clave en todo momento, por las experiencias y ese ejemplo de tener un reto cada día.

A mi papá, por enseñarme las reglas básicas de la vida y por ser parte fundamental de este proyecto de superación.

A Luis Alberto, por su cariño y apoyo incondicional en todo momento, por estar a mi lado mostrándome siempre el lado positivo del camino.

A mi familia en general, mellitos, abuelos, tías, tíos, primas, primos por siempre estar al pendiente y hacer de todo algo más alegre.

A todos los amigos y compañeros que a lo largo de la aventura me han permitido compartir su valiosa amistad y tiempo

Daniel Enríquez, Isaira Pérez, Dalí Alvarado, Tannia Ramírez, Diana Vistraín, Hugo Olaya, Andrés Carrasco, Juan Méndez, Christian Toriz, Katia Molina, Danniell Jasso, Daniel Gaspar, Zaira Vargas, Berenice Mancera, Hunahpu Marcos, Pavel Reyes, Yasbeth Sandoval.

A mi tutor el Dr. Gonzalo Montoya Ayala, por el nuevo conocimiento en el que me facilitó adentrarme, su paciencia, dedicación, disposición y la libertad que me otorgó para desarrollar este trabajo.

A la C.D. Lila Areli Domínguez por toda su ayuda, apoyo y paciencia durante esta etapa.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas al conocimiento y permitir que me desarrolle y forje en el ámbito profesional y social.

*“El pesimista se queja del viento,
el optimista espera que cambie,
el realista ajusta las velas. “*

William George Ward

“Daría la mitad de lo que sé por la mitad de lo que ignoro.”

René Descartes

1. INTRODUCCIÓN

El trabajo que se presenta a continuación es una revisión actualizada acerca de los avances en la ingeniería de tejidos para la regeneración craneofacial.

La pérdida de tejidos constituye uno de los problemas más frecuentes, devastadores y costosos para los sistemas sanitarios de los países desarrollados. Además, según estadísticas recientes, la demanda de órganos y tejidos, así como la aparición de enfermedades neurodegenerativas ligadas al proceso de envejecimiento de la población, van claramente en aumento. El tratamiento actual para todo este tipo de alteraciones se basa en el trasplante de órganos y/o tejidos.

Los avances y el interés científico por resolver estos trastornos, han logrado impulsar el campo de la ingeniería de tejidos, permitiendo que lo que hasta hace poco resultara ciencia ficción, hoy se convierta en realidad.

En la práctica odontológica, uno de los más grandes retos es la regeneración de tejidos que se han perdido por lesiones o patologías. En este sentido, la “Ingeniería de Tejidos”, propone nuevas terapias que implican la regeneración o reemplazo de tejidos u órganos a través de constructos tridimensionales tisulares, que devuelvan la forma y función, a partir de las propias células del paciente, en conjunto con biomateriales y biomoléculas.

En lo que se refiere a la regeneración de tejidos como pulpa dental, hueso y mucosa oral, se han realizado avances importantes que, en algunos casos, ya se han llevado a la práctica clínica. La Ingeniería de Tejidos da lugar a un nuevo campo en la Odontología: La “Odontología Regenerativa” que conjunta ciencias básicas como Física, Química, Biología Celular y Ciencia de los Materiales. Los principales objetivos de este novedoso campo están encaminados a la regeneración, reparación o reemplazo bioartificial de

tejidos y órganos propios del cuerpo humano, que han sido dañados por diversos factores, tales como trauma, quemaduras, por enfermedades degenerativas como el cáncer o ciertas anormalidades congénitas. A pesar de los avances en esta materia, la investigación tiene un camino largo por recorrer, con el fin de que esta terapia sea confiable y eventualmente se lleve a la clínica.

Gracias a los avances en las investigaciones con células troncales, la regeneración de tejidos para restituir estructura y funciones es una realidad. Sin embargo, aún requiere de estudios que garanticen su éxito. Las células troncales aisladas de la médula ósea, el tejido adiposo, pulpa dental, dientes deciduos, o el periodonto fueron llevados a jugar un papel importante en la regeneración de tejidos incluyendo regeneración craneofacial del defecto óseo, la regeneración del nervio facial, la regeneración del cartílago del cóndilo, la regeneración del disco de la articulación temporomandibular (ATM) y los órganos dentarios en estudios controlados.

2. OBJETIVO

- Conocer y describir los avances conceptuales sobre ingeniería de tejidos.
- Determinar el papel de diversos fenotipos celulares en la regeneración craneofacial.
- Identificar las moléculas biofuncionales con potencial regenerativo.
- Describir las características de los diversos andamios empleados en la regeneración craneofacial.
- Conocer las nuevas técnicas empleadas en la ingeniería de tejidos como posibles terapias en la regeneración craneofacial.

3. ANTECEDENTES

La investigación en lo que hoy se denomina Ingeniería de Tejidos comenzó aproximadamente en 1987, su desarrollo ha sido espectacular y la construcción de tejidos para su uso en medicina empieza a configurarse, no solo como una línea de investigación fundamental y prioritaria en las universidades y hospitales, sino también en compañías privadas.¹

En 1975 El equipo del Dr. Rheinwald a partir de los trabajos con una línea de queratinocitos originada de un teratoma de ratón, establecieron las condiciones necesarias y fundamentales para cultivar, de forma indefinida, este tipo de células. La primera aplicación clínica se produce en 1980, el equipo del Dr. Banks-Schelegel demuestra la viabilidad del epitelio cutáneo obtenido in vitro empleándolo como injerto en animales de experimentación, lo cual llevó al perfeccionamiento de estas técnicas haciendo posible la utilización de estos tejidos, obtenidos en el laboratorio, en la práctica clínica.¹

En 1989 Charles Vacanti logró reproducir condrocitos humanos in vitro en un andamio biodegradable. Después de refinar las técnicas y la obra de Robert Langer en 1997 Vacanti y sus colegas de Massachusetts hicieron crecer una estructura de cartílago que asemeja una oreja humano en la parte posterior de un ratón desnudo usando un esqueleto de polímero y condrocitos de la rodilla de una vaca. En 1991 Vacanti dijo haber acuñado el término ingeniería de tejidos en el contexto de la sustitución de órganos.¹

En 1993, Langer y Vacanti definieron ingeniería de tejidos como “Un campo interdisciplinario en donde se aplican los principios de ciencias de ingeniería y de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función del tejido u órgano”. La ingeniería de tejidos emergió como un nuevo campo que envuelve la combinación de células,

andamios y agentes bioactivos para fabricar nuevos tejidos funcionales en remplazo a los tejidos damnificados.¹

4. GENERALIDADES DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

En los últimos años se ha desarrollado dentro de la investigación médica y odontológica un nuevo campo de conocimiento altamente prometedor, conocida con el nombre de “Ingeniería de Tejidos”.²

La Ingeniería de Tejidos es un área multidisciplinaria que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la salud para el desarrollo de estructuras biológicas, con el fin de generar tejidos que permitan restaurar, mantener o mejorar la función del tejido u órgano primitivo. Para lograr este fin, la ingeniería de tejidos debe combinar armoniosamente materiales y componentes celulares con el objeto de utilizarlos en tratamientos específicos que garanticen el éxito terapéutico.²

La Ingeniería de Tejidos se basa principalmente en tres componentes fundamentales:

- 1) Células
- 2) Moléculas de señalización, inductores o factores de crecimiento
- 3) Andamios (Figura 1).



Figura 1. Triada de la ingeniería de tejidos

Las células son los componentes fundamentales del tejido, y los tejidos son la unidad básica de la función en el cuerpo. Generalmente, grupos de células forman y secretan sus propias estructuras de soporte, llamadas matriz extracelular. Esta matriz, o andamio, hace más que sólo servir como soporte para las células; también actúa como una estación repetidora para varias moléculas de señalización. Por consiguiente, las células reciben mensajes de muchas fuentes que se vuelven disponibles desde el entorno local.³

Cada señal puede iniciar una cadena de respuestas que determina qué le sucede a la célula. Al entender cómo responden las células individuales a las señales, cómo interactúan con su entorno y cómo se organizan en los tejidos y organismos, los investigadores han podido manipular estos procesos para sanar los tejidos dañados o incluso crear nuevos. El proceso frecuentemente comienza con la construcción de un andamio a partir de un amplio grupo de fuentes posibles, desde proteínas hasta polímeros. Una vez que se crean los andamios, se pueden introducir células con o sin un “coctel” de factores de crecimiento. Si el entorno es adecuado, se desarrolla un tejido.³

En algunos casos, las células, los andamios y los factores de crecimiento se mezclan todos al mismo tiempo, permitiendo que el tejido se “autoensamble”. Otro método para crear un tejido nuevo utiliza un andamio existente. Las células de un órgano donado se desprenden y el andamio de colágeno restante se usa para crecer un tejido nuevo. Este proceso ha sido utilizado para la regeneración de corazón, hígado, pulmón y riñón. Este enfoque ofrece grandes esperanzas para utilizar el andamiaje con el tejido humano descartado durante una cirugía y combinarlo con las propias células de un paciente para hacer órganos personalizados que no sean rechazados por el sistema inmunológico.³

4.1 CÉLULAS

El cuerpo humano posee aproximadamente 100 trillones de células, con aproximadamente 260 diferentes fenotipos que se asocian en el espacio y en el tiempo para formar los tejidos y los órganos.²

Las células más próximas a una lesión pueden restaurar el daño por el denominado mecanismo de diferenciación. Se entiende por este último, la posibilidad que tiene una célula de diferenciarse, perder sus características originales y con posterioridad adquirir propiedades nuevas.³

La ingeniería de tejidos del complejo craneofacial emplea células especializadas que contribuyan a la regeneración del tejido perdido, por lo que el conocer la naturaleza y características de las mismas es un requisito indispensable.

Células del tejido óseo

El hueso es una forma especializada de tejido conjuntivo que, como otros tejidos conjuntivos está compuesto por células y matriz extracelular. La característica que distingue al tejido óseo de los otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, que produce un tejido muy duro capaz de proveer sostén y protección. La matriz mineralizada consiste de fosfato de calcio en la forma de cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. En virtud de su contenido mineral el tejido óseo sirve también como sitio de depósito de calcio y fosfato.⁴

Los principales componentes orgánicos estructurales de la matriz ósea son la colágena tipo I y, en menor medida, la colágena tipo V. Se han encontrado también vestigios de otros tipos de colágena, como los tipos III, XI y XIII. Todas las colágenas constituyen alrededor del 90% del peso total de las proteínas de la matriz ósea. La matriz también contiene otras proteínas no colágenas que forman la sustancia fundamental del tejido óseo. Constituyen el 10% del peso total de las proteínas de la matriz ósea, son indispensables para el desarrollo, el crecimiento, el remodelado y la reparación del hueso. Tanto el colágeno como los componentes de la sustancia fundamental se mineralizan para formar el tejido óseo.⁴

Los cuatro grupos principales de proteínas no colágenas que hay en la matriz ósea son:

- **Macromoléculas de proteoglicanos**, que contienen una proteína central con cantidades diversas de cadenas laterales de **glucosaminoglucanos** (GAGs) (hialurano, condroitin sulfato y queratán sulfato) unidos de forma covalente. Contribuyen a que el tejido óseo ofrezca resistencia a la compresión. También tienen a su cargo la fijación de factores de crecimiento e inhibirían la mineralización.

- **Glucoproteínas multiadhesivas**, que actúan en la adhesión de las células óseas y las fibras colágenas a la sustancia fundamental mineralizada. Algunas de las más importantes son la **osteonectina** (que sirve como adhesivo entre el colágeno y los cristales de hidroxapatita) y **sialoproteínas** como la **osteopontina** (media la adhesión de las células a la matriz ósea) y las **sialoproteína ósea (BSP)** (que median la adhesión celular e inician la formación de fosfato de calcio durante el proceso de mineralización).
- **Proteínas dependientes de la vitamina K osteoespecíficas**, que incluyen la **osteocalcina** (captura el calcio desde la circulación y atrae y estimula los osteoclastos en el remodelado óseo), la **proteína S** y la **proteína de la matriz Gla (MGP)**.⁴

En el tejido óseo existen cuatro tipos celulares, a saber:

- **Células osteoprogenitoras**, derivadas de las células troncales mesenquimales que dan origen a los osteoblastos
- **Osteoblastos**, células que secretan la matriz extracelular del tejido óseo; una vez que la célula queda rodeada por la matriz secretada pasa a llamarse osteocito.
- **Osteocitos**, en la matriz ósea hay espacios llamados lagunas u osteoplastos, cada uno de los cuales contiene una célula llamada osteocito el cual extiende una gran cantidad de prolongaciones en túneles estrechos denominados canaliculos. Los canaliculos atraviesan la matriz mineralizada para conectar las lagunas contiguas y permitir el contacto entre las prolongaciones de osteocitos vecinos. El tejido óseo depende de los osteocitos para mantener su viabilidad

- **Osteoclastos**, son células de resorción ósea presentes en superficies óseas en las que el hueso se está eliminando, remodelando o donde el hueso ha sido lesionado.⁴

Las células osteoprogenitoras y los osteoblastos son precursores del desarrollo de los osteocitos. Los osteoclastos son células fagocíticas resultantes de la fusión de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea que dan origen a los linajes granulocítico neutrófilo y monocito.

Las células óseas se identifican particularmente bien en el hueso inmaduro de crecimiento intensivo durante el periodo embrionario.⁴

Ya que el tejido óseo presenta gran resistencia, también es propenso a ser lesionado o destruido fácilmente, por esta razón los trabajos de investigación sobre la reparación de defectos óseos comenzaron hace varios siglos.⁵

En Odontología, los defectos óseos son afecciones que oscilan desde recesiones que miden milímetros hasta la resección completa de la mandíbula, y que son tratadas, por ejemplo, con hueso liofilizado, membranas o bien prótesis metálicas, que en la mayoría de los casos devuelven la función de manera limitada.²

Células del tejido cartilaginoso

El tejido cartilaginoso es un tejido avascular compuesto por condrocitos y una matriz extracelular abundante. Más del 95% del volumen del cartílago corresponde a matriz extracelular, que es un elemento funcional de ese tejido. Los condrocitos son escasos pero indispensables para la producción y el mantenimiento de la matriz. La matriz es sólida y firme aunque un poco maleable, lo que le imparte cierta elasticidad. Como no hay una red vascular

dentro del tejido, la composición de la matriz extracelular es decisiva para la supervivencia de los condrocitos. La gran proporción de glucosaminoglucanos con respecto a la colágena de tipo II en la matriz cartilaginosa permite la difusión de sustancias entre los vasos sanguíneos del tejido conjuntivo circundante y los condrocitos dispersos, con lo que se mantiene la viabilidad del tejido. La presencia de una gran cantidad de aglomeraciones de proteoglucanos en la matriz cartilaginosa para soportar peso, en especial en los puntos de movimiento constante, como las articulaciones sinoviales.⁴

Según las características de la matriz el tejido cartilaginoso se divide en tres tipos que difieren en cuanto a su aspecto y sus propiedades mecánicas:

- + Cartílago hialino, caracterizado por una matriz que contiene fibras colágenas de tipo II, GAG, proteoglucanos y proteínas multiadhesivas.
- + Cartílago elástico, caracterizado por fibras elásticas y láminas elásticas además del material de matriz del cartílago hialino.
- + Cartílago fibroso, caracterizado por una abundancia de fibras colágenas de tipo I además del material de matriz del cartílago hialino.

En el cuadro, (Figura 2) se ofrece una lista de las características, las funciones y las ubicaciones de cada tipo de tejido cartilaginoso.⁴

Reseña de las características de los tipos de tejido cartilaginoso.


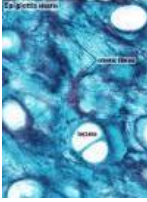

Características	Cartílago hialino	Cartílago elástico	Cartílago fibroso
			
Ubicación	Tejido esquelético fetal, discos epifisarios, superficie articular de las diartrosis, cartílagos costales, cartílagos de las cavidades nasales, laringe (tiroides, cricoides y aritenoides), anillos traqueales, placas cartilagosas bronquiales.	Pabellón auricular, conducto auditivo externo, trompa de Eustaquio, algunos cartílagos laríngeos, (epiglotis, corniculados y cuneiformes)	Discos intervertebrales, sínfisis pubiana, discos articulares (articulaciones esternoclavicular y temporomandibular), meniscos (articulación de la rodilla), complejo fibrocartilaginoso triangular (articulación de la muñeca), inserciones tendinosas
Función	Resistente a la compresión, provee amortiguación, superficie lisa y de baja fricción para las articulaciones, sostén estructural en el aparato respiratorio (laringe, tráquea, bronquios), constituye el fundamento del desarrollo del esqueleto fetal, la osificación endocondral y el crecimiento de los huesos largos	Proveen sostén flexible	Resiste la deformación por fuerzas externas
Presencia de pericondrio	Sí, (excepto en el cartílago articular y en los discos epifisarios)	Sí	No
Calcificación	Sí, (p. ej., durante la osificación endocondral)	No	Si (p.ej., calcificación del callo fibrocartilaginoso durante la reparación ósea)
Tipos celulares	Condroblastos, condrocitos	Condroblastos, condrocitos	Condrocitos, fibroblastos
Componentes típicos de la matriz extracelular	Fibrillas de colágena de tipo II, agregano (el proteoglicano más importante)	Fibrillas de colágena de tipo II y fibras elásticas, agregano	Fibras de colágena de los tipos I y II, versicano (proteoglicano secretado por los fibroblastos)

Figura 2. Características del tejido cartilaginoso⁴

El proceso de desarrollo del cartílago, comienza cuando se aglomeran células mesenquimales condroprogenitoras y forman un cúmulo celular redondeado y denso. La mayor parte del cartílago tiene su origen en cúmulos de ectomesénquima derivado de células de la cresta neural. ⁴

Conocido como nódulo condrogénico, un cúmulo de células mesenquimales o ectomesenquimales señala el sitio de formación del cartílago hialino. La expresión del **factor de transcripción SOX-9** desencadena la diferenciación de estas células en **condroblastos**, los que se van separando progresivamente conforme depositan matriz a su alrededor. Una vez que el material de matriz los ha rodeado por completo reciben el nombre de **condrocitos**.⁴

En el tejido cartilaginoso existen tres tipos celulares:

- **Células condrogénicas**, son células que derivan de las células mesenquimales y dan origen a los condroblastos. Son células secretoras por excelencia y producen activamente la matriz extracelular (MEC) del cartílago.
- **Condroblastos**, son células de morfología redondeada, metabólicamente activas, que contienen un gran núcleo con nucleolos prominentes. El citoplasma presenta un carácter basófilo con abundantes organelos implicados en la síntesis de proteínas.
- **Condrocitos**, a medida que los condroblastos van segregando matriz extracelular, los condroblastos se transforman en condrocitos, los cuales quedan alojados en un espacio o lagunas denominadas condroplasma o condroceles. Son células más pequeñas que los condroblastos y con escasa actividad metabólica.⁶

El tejido cartilaginoso tiene su origen en el mesénquima. El parentesco de las células cartilaginosas con los fibroblastos se comprueba en experimentos con cultivos celulares, que muestran que según las condiciones físicas o químicas del cultivo pueden formarse células cartilaginosas o fibroblastos.⁵

Fibroblastos

Los fibroblastos tienen a su cargo la síntesis de las fibras colágenas, reticulares, elásticas y los carbohidratos complejos de la sustancia fundamental. La investigación indica que un solo fibroblasto es capaz de producir todos los componentes de matriz extracelular. Los fibroblastos se ubican muy cerca de las fibras colágenas.⁴

Los fibroblastos presentes en algunos sitios constituyen una población replicativa de células que tienen una relación física particularmente íntima con el epitelio en la renovación y en la diferenciación normal en el organismo adulto.⁴

Cabe destacar que los fibroblastos pueden adquirir formas distintas en órganos diferentes. Estas formas, junto con sus funciones generales, cumplen con las tareas especiales específicas de los órganos.⁴

En términos generales, las células que participan en la construcción de un nuevo tejido, deben tener capacidad reproductiva; esto es, células en ciclo celular que no hayan entrado todavía en el proceso de diferenciación terminal. Se trata por lo tanto de células madre capaces de dar origen a células hijas más diferenciadas.⁴

Ciertas células del tejido conjuntivo laxo del adulto retienen la potencialidad múltiple de las células mesenquimales embrionarias. Estas células, llamadas células troncales mesenquimales, dan origen a células diferenciadas que actúan en la reparación y la formación de tejido nuevo. Son aquellas células que poseen la capacidad de auto-renovarse sin límite, y que son capaces de originar células hijas destinadas a la diferenciación terminal.⁴

Se debe identificar y aislar una línea celular, que sea fácil de multiplicar y por lo tanto satisfaga la demanda existente. La naturaleza y las características de las líneas celulares pueden ser variadas, pudiendo emplearse desde células autólogas hasta aloinjertos o xenoinjertos. Sin duda alguna, la administración de células autólogas es la más adecuada ya que evita el riesgo de rechazo inmunológico, pero en muchos casos resulta imposible obtener estas células del propio paciente. Por esta razón, se estudia el empleo de tejidos que procedan de otros individuos u otras especies, para lo cual se requiere reducir al máximo la antigenicidad de los mismos y extremar las medidas de bioseguridad que eviten infecciones o zoonosis.⁵

4.1.1 CÉLULAS TRONCALES

Las células troncales son aquellas células dotadas simultáneamente de la capacidad de autorrenovación es decir, producir más células troncales y originar células hijas comprometidas en determinadas rutas del desarrollo, que se convertirán finalmente por diferenciación hacia linajes celulares con características y funciones especializadas. En el contexto de la actual investigación, se pretende obtener células troncales que se mantengan como tales en cultivo en el laboratorio, y que bajo determinados estímulos puedan conducir a poblaciones de células diferenciadas.⁷

Las células madre o troncales, presentan dos notables propiedades: pluripotencia y capacidad de contribuir a la línea germinal. La Pluripotencia hace referencia a la capacidad que tiene las células madre de diferenciarse in vivo e in vitro en una gran diversidad de tipos celulares.⁷

Es decir, estas células se pueden clasificar de dos maneras:

- Según el tejido de origen; en células madre embrionarias o adultas.
- Según su potencial de diferenciación hacia diversos linajes celulares tomando en cuenta el desarrollo embrionario, en; totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales.⁸

Las células **totipotentes** son aquellas capaces de dar origen a un organismo completo y a un tejido extraembrionario.

Las células troncales **pluripotentes** producen células derivadas de cualquiera de las tres capas embrionarias, mesodermo, endodermo y ectodermo.

Las células **multipotentes** generan todos los tipos celulares derivados de una sola capa embrionaria. Entre este tipo de células se encuentran las células madre neuronales, hematopoyéticas y mesenquimales.

Por último, las células troncales con un menor potencial para diferenciarse son conocidas como **unipotentes**. Un ejemplo de éstas son las células madre epidérmicas encontradas en la capa basal de la piel y que únicamente producen escamas queratinizadas.⁸

Desde 1998, es factible la obtención de células madre humanas, así como de las posibles aplicaciones de estas en el diseño de nuevos medicamentos.

El uso que más ha llamado la atención, es el empleo de las células troncales para terapias celulares o incluso la ingeniería de tejidos.⁷

Actualmente se pueden obtener células madre a partir de hígado fetal, sangre de cordón umbilical, médula ósea, ligamento periodontal, dientes deciduos, terceros molares (Figura 3) y del tejido adiposo.⁷

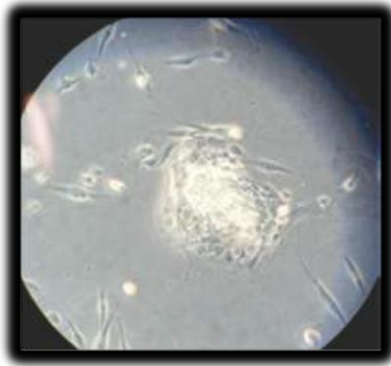


Figura 3. Células troncales de pulpa dental de terceros molares.⁹

Las células troncales pueden ser de dos tipos: El primero, las células madre hematopoyéticas, que da origen a la línea de células sanguíneas e inmunes. Y el segundo, las células madre mesenquimales (MSC), se diferencian *in vitro* e *in vivo* en derivados de los tres linajes embrionarios: endodermo, ectodermo y mesodermo, constituyendo una población totalmente diferente de las células madre hematopoyéticas, su papel es contribuir a la regeneración de los tejidos mesenquimáticos (hueso, cartílago, músculo, ligamento, tendón, tejido adiposo, estroma, etc).

Se han aislado y cultivado MSC humanas, (Figura 4) y se ha logrado su diferenciación controlada hasta células con rasgos típicos de osteocitos, condrocitos, adipocitos.⁷

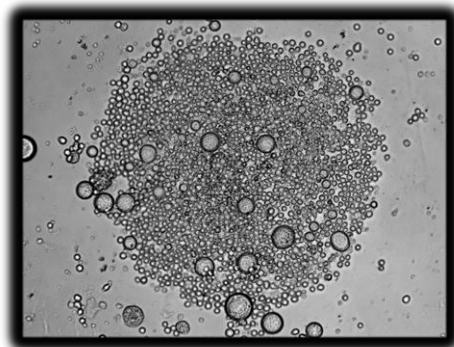


Figura 4. Cultivo de células troncales¹⁰

Aun cuando también existe la posibilidad de obtener células troncales de algunos tejidos adultos, éstas son mucho más escasas y muestran menos plasticidad que las embrionarias (Figura 5).¹⁰

Las células mesenquimales de la pulpa dental representan una alternativa bastante atractiva para este fin dado que poseen ventajas de ser células altamente proliferativas, de fácil manipulación *in vitro* y de forma importante son células que se pueden aislar con un mínimo de invasividad sobre el paciente.¹⁰

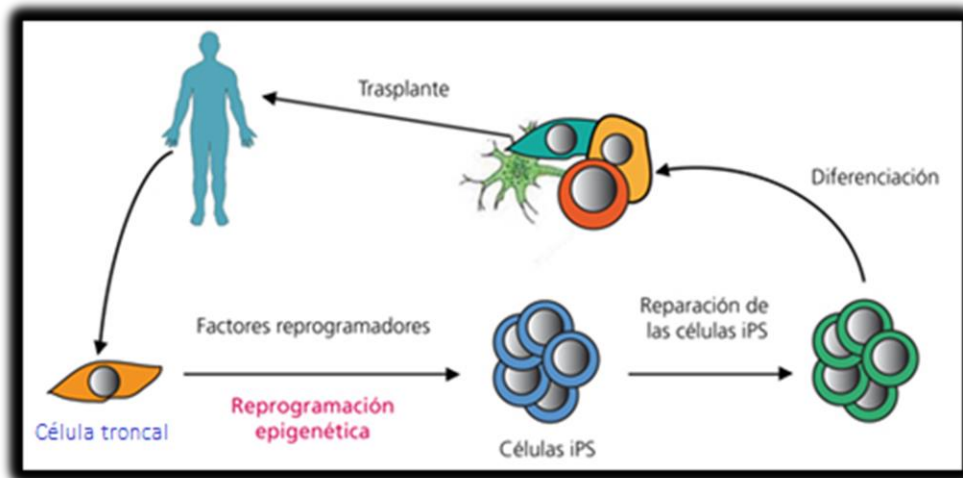


Figura 5. Esquema de la generación de células iPS y su posible aplicación terapéutica.¹⁰

La tecnología con células troncales (tanto embrionarias como adultas) ofrece múltiples aplicaciones terapéuticas que van desde la creación de islotes pancreáticos, sangre y válvulas cardíacas hasta la construcción de cartílagos nasales o sustitutos de órganos como la vejiga urinaria.³

Las células troncales pluripotentes son células con la capacidad de derivar todos los tipos celulares del organismo adulto. Los conflictos bioéticos aunado a la complejidad de su control proliferativo o la formación de teratomas han retrasado la investigación sobre las células troncales

embrionarias y su posible aplicación clínica. Sin embargo, el descubrimiento de Shinya Yamanaka con la generación de células troncales pluripotentes inducidas (iPS) a partir de células diferenciadas por procesos de reprogramación, permitió evadir los problemas bioéticos y desarrollar líneas de células iPS capaces de derivar todos los tejidos del organismo adulto tal como lo hacen las células troncales embrionarias.⁷

4.1.2 iPS

En 2006, Shinya Yamanaka encontró una nueva manera de “reprogramar” células especializadas adultas para convertirlas en células madre. Las iPSC, (induced pluripotent stem cells) son células adultas reprogramadas genéticamente para funcionar como células troncales embrionarias (CTE) capaces de convertirse, en teoría cuando menos, en cualquier célula y tejido del organismo.¹¹

Esta capacidad es la que se busca utilizar en la llamada “ingeniería de tejidos” para trasplantar con fines de curación, tejidos fabricados en el laboratorio a pacientes con diversos padecimientos degenerativos.

El problema de las CTE, está en que las fuentes más comunes para obtenerlas son:

- Embriones sobrantes de esfuerzos de fertilización asistida.
- Embriones fabricados para este propósito mediante transferencia nuclear, que consiste en introducir a un óvulo enucleado el núcleo de una célula somática y cultivarlos unos días para obtener una estructura muy similar al blastocisto (embrión de seis días, en el humano) de cuyo interior se pueden obtener alrededor de 150 CTEs.¹⁰

Al contrario de las células madres embrionarias, obtener células iPS no depende del uso de células de un embrión temprano. Existen diferencias ya

que, investigaciones recientes indican que algunos de los genes en las células iPS se comportan de manera diferente a aquellos que encontramos en las células madre embrionarias. Esto se debe a la reprogramación incompleta de las células y/o a los cambios genéticos adquiridos por las células iPS cuando crecen y se multiplican.¹⁰

La reprogramación celular tiene un gran potencial para el desarrollo de nuevas aplicaciones médicas, como las terapias de reemplazamiento celular. Como las células iPS provienen del propio paciente, pueden ser usadas para cultivar células especializadas que son completamente compatibles con el paciente y que no serán rechazadas por el sistema inmune. Si el paciente tiene una enfermedad genética, el problema genético puede ser corregido en sus células iPS en el laboratorio, y utilizarse para producir una remesa de células especializadas sanas específicas de paciente para trasplante. Pero su beneficio es solo teórico por ahora.¹¹

Hasta hace poco, generar células iPS implicaba cambios genéticos permanentes en el interior celular, lo que podía causar la formación de tumores. Son necesarias investigaciones más exhaustivas para el completo entendimiento de cómo funciona la reprogramación celular y cómo las células iPS pueden ser controladas y producidas de la forma más consistente posible para alcanzar los requerimientos de seguridad y alta calidad para su uso en la clínica.¹¹

Las células madre, presentan diversos patrones de diferenciación: Pueden ser por señales externas e internas: múltiples mecanismos de retroalimentación y de interacciones recíprocas entre células. Aquí la investigación básica está esclareciendo las moléculas de señalización que se envían unas células a otras, ponen en marcha una serie de factores para activar genes, cuyos productos ejercen una serie de efectos en las células llevándolas hacia a la diferenciación. Por lo tanto, la célula puede cambiar su

patrón de expresión, lo que en determinados casos significa un paso más en su ruta de proliferación o diferenciación.¹¹

4.2 MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN

La mayor parte de la información sobre moléculas de señalización que se utiliza en la Ingeniería de tejidos, procede de estudios realizados *in vitro* sobre los que se han aplicado distintos factores solubles.²

La ingeniería de tejidos se ha basado en la investigación de los mecanismos que regulan la morfo-diferenciación del embrión. Dichos hallazgos han permitido conocer cuáles son las moléculas de señalización que inducen la diferenciación celular y establecen las propiedades fenotípicas de las células y los tejidos en los seres vivos. Estas moléculas incluyen a los factores de crecimiento, secuencias peptídicas específicas y proteínas de liberación controlada.²

Estas moléculas de señalización son producidas por una célula para actuar sobre otras células mediante receptores específicos que regulan la expresión génica para inducir la diferenciación celular. Las moléculas que han demostrado participar más activamente en el desarrollo de las estructuras craneofaciales son el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP).²

Para poder imitar un tejido nativo se debe crear un molde que simula la matriz del tejido que se requiere regenerar, aquí las células responden al medioambiente extracelular detectando señales químicas o estímulos físicos que desencadenan la apropiada respuesta de las mismas mediante la

activación de distintos mecanismos moleculares y biológicos que conducen a división, migración, diferenciación, mantenimiento del fenotipo o apoptosis.

La participación de estas sustancias en la construcción de nuevos tejidos es fundamental pues contribuyen a su crecimiento y desarrollo al igual que ocurre en condiciones ortotípicas.²

El mecanismo por el cual pueden introducirse en el nuevo tejido con ciertas garantías, aparte de su inyección por vía directa, que conduce a una rápida eliminación debido a la corta vida de los mismos, es su incorporación en los biomateriales de soporte, lo que permite una exposición y liberación prolongada de dichos factores, controlable por la tasa de difusión de los mismos o por la degradación del polímero.²

4.2.1 FACTORES DE CRECIMIENTO

Se definen como un tipo de mediadores biológicos que regulan acontecimientos claves de reparación de tejido; estos acontecimientos son proliferación celular, quimiotaxis (migración celular dirigida), diferenciación celular y síntesis de matriz extracelular.⁵

Cada factor de crecimiento tiene una o varias actividades concretas fundamentales, y sus acciones específicas en una célula concreta dependerán de las circunstancias concretas del entorno celular. Para transmitir una señal concreta, una vez liberados de la célula que los fabrica, deben interactuar con su receptor correspondiente. Estos receptores son unas proteínas que se encuentran en la membrana celular. La unión de los factores de crecimiento (FGs) a sus receptores específicos es lo que desencadena las acciones biológicas, convirtiendo este acontecimiento extracelular (la unión del ligando al receptor) en un acontecimiento intracelular;

se transmite un estímulo al interior de la célula, donde se amplifica esta señal y se encauza de forma específica. La amplificación de esta señal implica un amplio espectro de enzimas con funciones especializadas.⁵

Algunos factores de crecimiento se reconocen como multifuncionales; estos pueden por un lado estimular la proliferación de ciertos tipos celulares, y por otro lado inhibir la proliferación de otros y además causar efectos no relacionados con la proliferación en otro tipo de células.

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet derived growth factor).

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endothelial growth factor).

TGF- β : factor de crecimiento transformado tipo β . (transformed growth factor).

AFGF y bFGF: factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico (acidic and basic fibroblastic growth factors).

IGF-I y IGF-II: factores de crecimiento insulínico tipo I y II (insulin like growth factors).

EGF: factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor).⁵

Además de estos factores de crecimiento existe una superfamilia de proteínas también implicadas en la señalización celular del tejido óseo denominadas proteínas morfogenéticas BMPs.³

Su existencia se descubrió al observar que ciertos tejidos parecían tener una sustancia osteogénica que inducía la formación de hueso nuevo.

Urist (1965) mostró que el hueso desmineralizado en ácido clorhídrico, liofilizado e implantado en lugares ectópicos, inducía la formación ósea. Este fenómeno se ha denominado principio de inducción ósea. La matriz desmineralizada del hueso implantado se sustituye por nueva matriz ósea y se mineraliza, produciéndose hueso reticulado que evoluciona a hueso cortical. Se identificaron un grupo de proteínas no colágenas en la matriz desmineralizada que eran las responsables de este fenómeno; se denominaron BMPs y fueron consideradas las responsables del principio de inducción ósea. Muchos GFs se han añadido a la superfamilia de las BMPs basándose en la homología de su secuencia de aminoácidos, como es el caso de la familia de proteínas TGF β (TGF β 1 hasta β 5).⁵

La regeneración periodontal se ha enfocado en el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento fibroblástico básico 2.⁵

Principales factores de crecimiento, su actividad y utilidad en odontología.

(BMP) Proteína morfogenética. Inducen a la diferenciación osteoblástica y mineralización del hueso. Puede ser utilizada para sintetizar células troncales y secretar matriz mineral.

(CSF) Factor estimulante de colonias. CFS como las citoquinas que estimulan la proliferación específica de células madre pluripotencial óseas. Pueden ser usadas para incrementar el número de células troncales .

(EGF) Factor de crecimiento epidermal. Promueve la proliferación de células mesenquimales y epiteliales. Pueden ser usadas para incrementar el número de células troncales .

(FGF) Factor de crecimiento fibroblástico. Promueve la proliferación de muchas células. Pueden ser usadas para incrementar el número de células troncales.

(PDGF) Factor de crecimiento derivado de las plaquetas. Promueve la proliferación del tejido conectivo y células del musculo liso. Pueden ser usadas para incrementar el número de células troncales.

(TGF Beta) Factor de crecimiento transformante beta. Promotor antiinflamatorio, promueve la reparación, inhibe la proliferación de macrófagos y leucocitos. Está presente en la matriz de la dentina y ha sido usada para promover la mineralización del tejido pulpar.¹²

4.2.2 PROTEÍNAS BMPs

Las proteínas morfogénicas óseas o BMPs, son un grupo de glucoproteínas reguladoras las cuales son miembros de la superfamilia de los factores transformantes de crecimiento (TGFs), a la cual pertenecen TGF- β , las inhibinas y las activinas.⁴

Estas proteínas participan en gran cantidad de respuestas biológicas como crecimiento celular, apoptosis o muerte celular y estimulan principalmente la diferenciación mesenquimal de las células madre en condroblastos y osteoblastos. Uno de los miembros de la familia BMP es BMP-4, esta proteína se expresa en el mesodermo. En humanos, las BMPs se expresan en medula ósea adulta y son esenciales en la remodelación del hueso y el crecimiento. Se ha demostrado que BMP-4 juega un papel importante en el crecimiento, diferenciación y capacidad de repoblar de las células madre hematopoyéticas (CMHs) del fenotipo CD34+CD38-Lin- mientras que altas concentraciones de BMP-2 y BMP-7 actúan de forma similar al TGF- β , inhibiendo la proliferación de estas células. En el campo de la regeneración periodontal, la investigación se ha enfocado en la proteína morfogénica ósea 2 (OP-2), en la proteína morfogénica ósea 3 (osteogenina) y en la proteína morfogénica ósea 7 (OP-1).⁴

Las BMPs son críticas para el desarrollo embrionario y la homeostasis del tejido en organismos adultos. Por otra parte, la mutación o eliminación de sus componentes origina patologías como la hipertensión arterial pulmonar, la telangectasia hemorrágica hereditaria, la fibroplasia osificante progresiva, así como anomalías esqueléticas y algunos tipos de cáncer.¹²

4.2.3 PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

Los aminoácidos se unen covalentemente a través de enlaces peptídicos, dando lugar a moléculas conocidas como péptidos y proteínas. En general los péptidos tienen un peso molecular inferior a 10 KDa, mientras que en las proteínas es superior a ese valor.¹³

La unión de dos o más aminoácidos, mediante enlaces amida, origina a los péptidos. El enlace peptídico es rígido debido a un fenómeno de resonancia y los seis átomos implicados se sitúan en un mismo plano.¹³

Los péptidos funcionales o bioactivos son moléculas que se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática.

Algunos de ellos tienen una función enzimática y participan en la regulación homeostática del organismo, al igual que los aminoácidos y proteínas son biomoléculas con un carácter anfótero.¹⁴

Una avenida emergente de la ingeniería de tejidos es el uso de péptidos de autoensamblaje (SAP) en conjunción con células troncales para mejorar la reparación de los tejidos dañados. La secuencia específica de péptido, propiedades mecánicas, y las señales nanotopográficas varían ampliamente

entre los distintos programas de ajuste estructural, muchos de los que se han utilizado para la regeneración de tejidos similares.¹⁴

Clasificación de los péptidos

Péptidos antimicrobianos. Los péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana ejercen un efecto inhibitor sobre los microorganismos de destino también mediante la interacción con los componentes intracelulares aniónicos como el ADN y el ARN, lo que inhibe la síntesis de proteínas y la división celular de los microorganismos.¹⁵

Peptidos inmunoreguladores. Los péptidos inmunomoduladores son liberados de las proteínas que los contienen de manera natural durante el proceso de la digestión en el tracto gastrointestinal, lo que afecta a la respuesta inmunológica y a la función celular en el mismo.¹⁵

Péptidos con actividad opiácea. Los péptidos con actividad opiácea, también llamados exorfinas, se definen como péptidos que presentan afinidad por receptores opiáceos y actúan, mediante la unión a receptores, como moduladores exógenos de la motilidad intestinal, de la permeabilidad epitelial y de la liberación de hormonas.¹⁵

Péptidos con actividad antioxidante. Los antioxidantes no sólo son importantes en la prevención de la oxidación en los alimentos, sino también a nivel fisiológico. Los radicales libres son unas moléculas que están en continua formación en las células y que son neutralizados de manera natural por las defensas antioxidantes del organismo. Sin embargo, existen factores que producen un desequilibrio en el número de radicales libres, y un exceso

de éstos puede dar lugar a un envejecimiento celular o al desarrollo de enfermedades.¹⁵

Péptidos con actividad antihipercolesterolémica La hiperlipidemia, en especial la hipercolesterolemia, es uno de los más importantes factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Este efecto hipocolesterolemiante de los péptidos bioactivos se atribuye a dos acciones de los mismos:

- Los péptidos bioactivos inhiben la absorción del colesterol, posiblemente debido a la represión de la solubilidad micelar del colesterol.
- Algunos péptidos pueden regular al alza, los receptores que están crónicamente suprimidos por la hipercolesterolemia o administración de colesterol de la dieta.¹⁵

Péptidos con actividad antihipertensiva. El mecanismo antihipertensivo más estudiado como actividad de los péptidos bioactivos es la inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La ECA es una enzima que cataliza la conversión de la angiotensina I (decapéptido) en angiotensina II (octapéptido). La angiotensina II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora.¹⁵

4.2.4 INTERLUCINAS

Conjunto de citocinas (proteínas que actúan como mensajeros químicos a corta distancia) de bajo peso molecular, mediadoras del crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación. Son sintetizadas principalmente por los leucocitos, aunque en algunos casos también pueden intervenir células endoteliales o del estroma del timo o de la médula ósea.¹⁶

Su principal función es regular los eventos que atañen a las funciones de estas poblaciones de células del sistema inmunitario, como la activación, diferenciación o proliferación, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis, regulación de otras citocinas y factores, entre otras. Son proteínas solubles de bajo peso molecular que ejecutan múltiples funciones vinculadas al crecimiento celular, inmunidad, diferenciación tisular, inflamación.¹⁶

Además de las células del sistema inmunitario, estas citocinas son producidas por diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Son el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión microbiana. La liberación de citocinas también es inducida por pequeños péptidos liberados.³

Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmunitaria específica. Se conocen en la actualidad no menos de 33 interleucinas, las cuales difieren entre sí tanto desde el punto de vista químico como del biológico. Mientras algunas de ellas (IL-4, IL-10, IL-11) presentan esencialmente efectos favorables, otras (IL-1, IL-6, IL-8), paralelamente a su función defensiva, pueden también ser deletéreas para el organismo.¹⁶

La IL-6 sirve como factor de crecimiento para las células B activadas, en la fase tardía de su diferenciación.³

Las fuerzas mecánicas continuas, dan lugar a movimientos y desplazamientos de los fluidos tisulares en el ligamento periodontal. En primer lugar origina, una distorsión gradual de la matriz extracelular y de las células, lo que altera la actividad de los canales iónicos y la polaridad de las membranas de las distintas células de la región. Como consecuencia de ello, las terminaciones nerviosas del ligamento periodontal liberan sustancias polipéptido intestinal y vasoactivo (VIP y P) que incrementan la permeabilidad

capilar y favorecen la extravasación de leucocitos y la secreción de citosinas y factores de crecimiento como IL-1, IL-6, TNF- α o INF- β , que estimulan la remodelación ósea.³

El fibroblasto del ligamento periodontal presenta, dos receptores de superficie muy característicos: el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la IL-1. El incremento de la IL-1 estimula la actividad sintética del fibroblasto que, entre otras sustancias produce colagenasa e IL-6. Esta última sustancia estimula de forma significativa la actividad osteoclástica¹⁵

4.3 MATRIZ EXTRACELULAR

Las células normales en los tejidos humanos, a excepción de las células de la sangre, residen y dependen de la adhesión de una matriz sólida llamada matriz extracelular (MEC).¹⁶

La MEC se puede dividir en dos componentes desde el punto de vista funcional: Sustancia fundamental amorfa y fibras el tejido conjuntivo.

Sustancia fundamental amorfa.

Es un gel bien hidratado que crea un espacio para el transporte de metabolitos, sustancias nutritivas y productos de degradación y que debido a su gran contenido de agua en los preparados para la microscopia óptica aparece clara y no estructurada (“amorfa”). Sus principales componentes moleculares son el hialurano, los proteoglucanos y diversas glucoproteínas.¹⁶

El hialurano es una molécula de glucosaminoglucano libre, sin unión a una proteína central.

Los proteoglicanos, al igual que el hialurano, son sintetizados y secretados por los fibroblastos. Están compuestos por una proteína central que tiene muchas cadenas laterales largas de glucosaminoglicanos (GAG). Los GAG típicos son el condroitín sulfato, el dermatán sulfato y el heparán sulfato y el hialurano.

Los Proteoglicanos más difundidos son; el agrecano, decorin, biglicano, fibromodulina, sindecano.¹⁶

El agrecano es el proteoglicano principal del cartílago. El decorin, el biglicano y la fibromodulina son proteoglicanos más pequeños, se unen a las fibrillas colágenas. El sindecano es un componente de las membranas celulares, fija factores de crecimiento, entre otros, y cumple una función en la transducción de señales y en la migración de las células a lo largo de las fibrillas colágenas. Entre las glucoproteínas más importantes de la sustancia fundamental figuran el nidógeno, la laminina y la fibronectina; en el hueso son particularmente importantes la osteonectina, la osteocalcina y la osteopontina, entre otras. La unión de estas proteínas a la célula con frecuencia está mediada por integrinas, que son proteínas de la membrana con función de receptor.¹⁶

La fibronectina es una proteína dimérica cuyos dos componentes individuales idénticos están unidos por medio de puentes disulfuro. Hay dos formas de fibronectina: la fibronectina plasmática y la llamada fibronectina fibrilar. La primera se sintetiza en el hígado y se encuentra disuelta en el plasma, interviene entre otras cosas, en la coagulación de la sangre y en la curación de las heridas. La fibronectina fibrilar es sintetizada por los fibroblastos maduros. Varias moléculas se unen para formar estructuras fibrilares delgadas en las superficies celulares o en la matriz (Figura 5).¹⁶

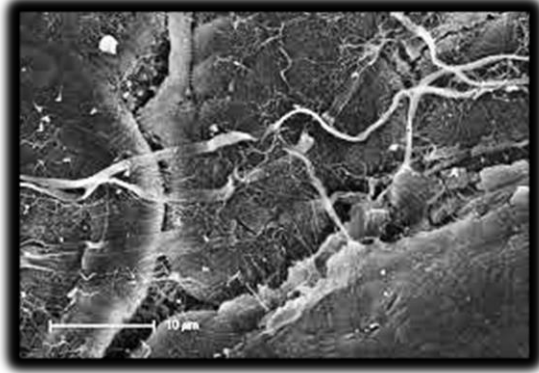


Figura 5. Microscopía electrónica de la matriz extracelular (Las cintas largas son fibras de colágeno) ¹⁶

La osteonectina, la osteocalcina y la osteopontina son componentes de la matriz ósea no colágena que se cree desempeñan un papel en la desmineralización y en la unión de la fase mineral a la matriz.¹⁶

Fibras del tejido conjuntivo

Las fibras del tejido conjuntivo son los elementos estructurales de este tejido.

Los dos tipos fundamentales de fibras del tejido conjuntivo son:

- Fibras colágenas, incluidas las fibras reticulares

Las fibras colágenas son resistentes a la tracción y apenas distensibles de modo que constituyen un material ideal para los ligamentos, las fascias, los tendones, la esclerótica, la dermis y la estroma de los órganos. Además son componentes importantes del hueso, la dentina y el cartílago. Las fibras están compuestas por moléculas de colágena que son producidas por fibroblastos y en el espacio extracelular en una especie de proceso de autoensamblaje se asocian en fibrillas, o como en el caso de la colágena tipo IV, en una red bidimensional de filamentos delgados. En los adultos tienen un recambio (formación, crecimiento y degradación) lento.

Las fibras reticulares (fibras de reticulina) son fibras ramificadas, unidas en forma de red, compuestas por colágeno tipo III. Las fibras relativamente delgadas están compuestas por haces de fibrillas de distribución extensa.

Las fibrillas colágenas de las fibras reticulares son más delgadas que las de las fibrillas de tipo I.¹⁶

- Fibras elásticas

Las fibras elásticas son extensibles y, en consecuencia, tiene las características de la goma. Forman sobre todo redes irregulares o estructuras laminares perforadas. Los ligamentos elásticos son infrecuentes en los seres humanos y solo aparecen en la región de la columna vertebral. Las fibras elásticas siempre están asociadas con las fibras colágenas no elásticas las cuales limitan su extensibilidad.¹⁶

La tabla a continuación enumera las características de los 12 tipos más comunes de fibrillas de colágena.

TIPO	COMPOSICIÓN DE LA CADENA	SÍMBOLO (S) DEL GEN	DETALLES ESTRUCTURALES	LOCALIZACIÓN
I	$[\alpha 1(I)]_2[\alpha 2(I)]$	COL1A1, COL1A2	300nm, 67nm fibrillas en banda	piel, tendón, hueso, etc.
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1	300nm, pequeñas 67nm fibrillas	cartílago, humor vítreo
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1	300nm, pequeñas 67nm fibrillas	piel, músculo, frecuentemente con tipo I
IV	$[\alpha 1(IV)]_2[\alpha 2(IV)]$	COL4A1 por COL4A6	390nm dominio globular C-terminal, no fibrilar	toda la lámina basal
V	$[\alpha 1(V)][\alpha 2(V)][\alpha 3(V)]$	COL5A1, COL5A2, COL5A3	390nm dominio globular N-terminal, fibras pequeñas	Mayoría de tejido intersticial, assoc. con tipo I

VI	[α 1(VI)][α 2(VI)][α 3(VI)]	COL6A1, COL6A2, COL6A3	150nm, N+C term. Dominios globulares, microfibrillas, 100nm fibrillas en banda	Mayoría de tejido intersticial, assoc. con tipo I
VII	[α 1(VII)] ₃	COL7A1	450nm, dímero	epitelio
VIII	[α 1(VIII)] ₃	COL8A1, COL8A2		algunas células endoteliales
IX	[α 1(IX)][α 2(IX)][α 3(IX)]	COL9A1, COL9A2, COL9A3	200nm, dominio globular N-term. unido a proteoglicano	cartílago, assoc. con tipo II
X	[α 1(X)] ₃	COL10A1	150nm, dominio globular C-term.	cartílago hipertrófico y mineralizante
XI	[α 1(XI)][α 2(XI)][α 3(XI)]	COL11A1, COL11A2	300nm, fibras pequeñas	cartílago
XII	α 1(XII)	COL12A1		interactúa con tipo I y III

Figura 6. Tipos de colágena¹⁷

Dentro de las moléculas funcionales en la MEC están los factores de crecimiento incluyendo el de crecimiento vascular endotelial (VEGF), los miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado del estroma (SDF-1), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento beta-transformador (TGF- β), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), el factor de crecimiento de hepatocito (HGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP).¹⁷

El tipo y cantidad exactos de cada componente dentro de la MEC son dependientes y están relacionados con los requerimientos específicos de cada tejido.¹⁷

Es importante entender los mecanismos de adhesión célula-matriz extracelular, y los componentes que intervienen en estos, ya que son un agente crucial en la regeneración tisular. En la gran mayoría de los organismos pluricelulares, las células se organizan en conjuntos cooperativos llamados tejidos, que a su vez, se asocian formando grandes unidades funcionales denominadas órganos.

Las células contactan, generalmente, con una compleja red de macromoléculas secretadas, denominada matriz extracelular. Esta participa en el mantenimiento de la estructura tisular y en los animales posee una organización reticular mediante la cual las células integrantes de un tejido también se mantienen en su lugar por medio de adhesiones intercelulares (Figura 7).¹⁷

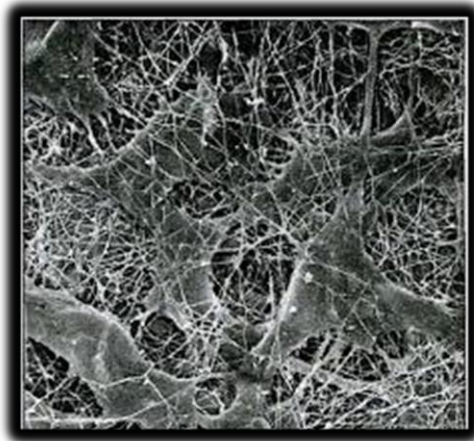


Figura 7. Micrografía de fibroblastos rodeados de matriz extracelular.¹⁷

4.3.1 INTEGRINAS

Para entender como interacciona la matriz extracelular con las células, es necesario identificar tanto las moléculas de la superficie celular (los

receptores de la matriz) que se unen a los diversos componentes de la matriz, como a los propios componentes de la matriz extracelular. Por ejemplo, la unión última a la célula requiere de una proteína transmembrana que una la matriz al citoesqueleto cortical de las células, algunos proteoglicanos con proteínas centrales transmembrana actúan como correceptores para los componentes de la matriz, pero los principales receptores en las células animales para la mayoría de proteínas de la matriz extracelular, incluyendo la colágena, la fibronectina y la laminina, son las integrinas, una gran familia de proteínas de unión, transmembrana y homólogas.¹⁵

El propósito de diseñar materiales biomiméticos no consiste solamente en reproducir las propiedades miméticas biomecánicas del tejido del huésped, sino también generar andamios tridimensionales que soporten las funciones esenciales de la célula, incluyendo: adhesión, crecimiento, proliferación, diferenciación, evitando reacciones tóxicas y respuestas inmunes adversas. Las características demandadas en los biomateriales en la ingeniería de tejidos incluyen susceptibilidad a la invasión vascular y en algunos casos la biodegradación y el reemplazo del biomaterial por matriz extracelular generada por el propio huésped.¹⁵

El andamio ideal para la ingeniería de tejidos y regeneración es aquel que asemeja las propiedades biomecánicas del tejido blanco y sirve como hospedero para las células tanto endógenas como implantadas. Además como soporte para adhesión celular y para el crecimiento, migración, diferenciación. No debe provocar respuesta inmune, con excepción de aquellos biomateriales en los cuales se requiere de su integridad para cumplir su función.¹⁸

El desarrollo de nuevos andamios con propiedades físicas, químicas y mecánicas debe seguirse explorando; actualmente, la combinación de

colágeno, hidroxiapatita y VEGF o bien péptidos osteogénicos y células madre, es el biocomplejo idóneo.⁵

Para este propósito, se han ido generando una amplia variedad de andamios de excelente biocompatibilidad y propiedades biomecánicas para asegurar la eficiencia y persistencia en la ingeniería de tejidos.

4.4 ANDAMIOS

El término biomaterial designa a aquellos materiales utilizados en la fabricación de sistemas biológicos y que se aplican en diversas ramas de la medicina. Entre las características de los materiales se encuentra la de ser biocompatibles, o biológicamente aceptables. De este modo, en la evaluación de un material resulta fundamental examinar su biocompatibilidad y capacidad de reabsorción; ya que permanecen en contacto con los tejidos vivos, por lo que resulta imprescindible que no se produzcan reacciones no deseadas en la interfase tejido-material y que mantenga sus propiedades durante el tiempo que tenga que desempeñar su función.³

Actualmente los estudios se enfocan en conocer las interacciones específicas entre propiedades físico-químicas del material, química de superficie, hidrofobicidad, propiedades mecánicas, adsorción isotérmica de ciertas proteínas y la observación de comportamientos celulares, como la adhesión, activación, liberación de citoquinas y factores de crecimiento.¹⁹

Existe en la actualidad una gran cantidad de biomateriales diferentes que según su composición se pueden clasificar en biomateriales metálicos, biomateriales cerámicos o biomateriales poliméricos naturales o sintéticos. En la Ingeniería de Tejidos, los biomateriales deben favorecer la función biológica y mecánica de las células ya que actúan como una matriz

extracelular artificial. Como resultado, los biomateriales pueden proporcionar a las células un espacio en tres dimensiones para formar los tejidos nuevos con la estructura y función apropiada.³

Como la mayoría de los tipos de células de mamíferos son dependientes de anclaje y pueden morir sino hay una base de adhesión celular; los biomateriales proporcionan un sustrato de adhesión que ofrece a las células sitios específicos en el cuerpo con una eficiencia de carga.³

Los biomateriales funcionan como andamio debido a sus propiedades de biocompatibilidad y similitud de estructura tridimensional. Además, las moléculas de señalización, como los péptidos de adhesión celular y factores de crecimiento, se pueden integrar junto con las células para ayudar a regular la función de las mismas.¹⁹

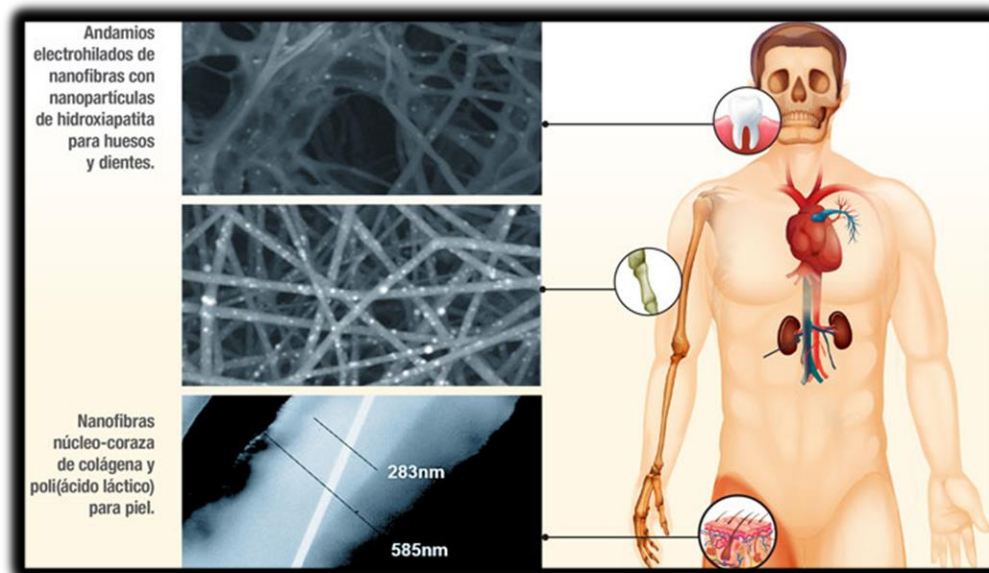


Figura 8. Andamios utilizados por la ingeniería de tejidos²⁰

4.4.1 ANDAMIOS PARA TEJIDOS BLANDOS

El andamio que sirve de apoyo a las células es un elemento de suma importancia en la reconstrucción de la mucosa y el epitelio. Para ello, se debe elegir el andamio adecuado; con una biocompatibilidad ideal, bioestabilidad, porosidad además de propiedades mecánicas, esto es un paso crucial en la ingeniería de tejidos. Los andamios utilizados en la reconstrucción de mucosa y epitelio se clasifican según su origen y estructura.¹⁹

Las matrices de origen natural se pueden dividir en 2 grupos: la dermis acelular y la membrana.

4.4.1.1 DERMIS ACELULAR HUMANA

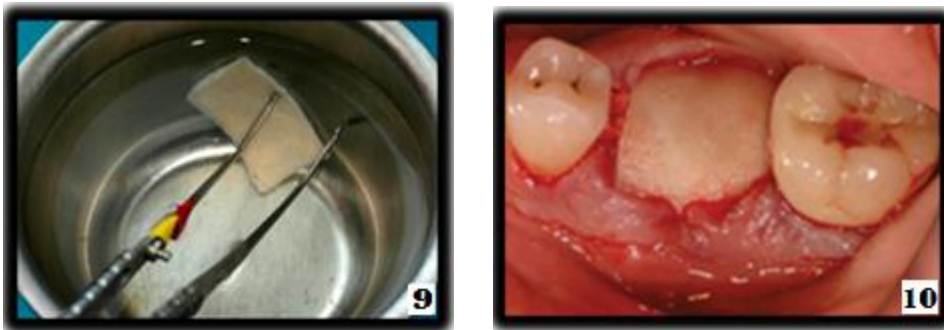
La dermis acelular de cadáver fue utilizada por Izumi y colaboradores como andamio para la ingeniería tisular de la mucosa oral. El Alloderm™ es una dermis de cadáver humano acelular, no inmunogénica que se caracteriza por que en una de sus caras laterales tiene una lámina basal adecuada para células epiteliales, y en la otra, canales receptores intactos adecuados para la infiltración de fibroblastos.²¹

Se obtiene de cadáveres humanos, de los cuales se remueve la dermis y el componente celular de la dermis. De esta manera, la integridad ultraestructural de la matriz extracelular es conservada; la matriz dérmica presenta colágena y elastina que no han sido dañadas llevando a una respuesta inflamatoria por parte del tejido del hospedero.²²

Desde su introducción a la odontología el Alloderm™ ha sido aceptada como una matriz de dermis acelular para aplicaciones en tejidos blandos, apoya la regeneración tisular, permitiendo la rápida revascularización, la migración y proliferación de células blancas, siendo un fuerte tejido huésped para la reparación natural.²¹

Una matriz de dermis acelular tiene una estructura porosa y fibrilar similar a la dermis nativa, la cual es preparada utilizando una técnica de liofilización después del tratamiento de descelularización (Figura 9).²¹

Su uso ha sido recomendado para ser usado para incrementar la zona de encía insertada alrededor de dientes e implantes, obteniendo así la cobertura de la raíz en recesiones gingivales, para preservar o incrementar el grosor de la encía en áreas edéntulas (Figura 10).²²



Figuras 9 y 10. Andamio de dermis acelular humana (Alloderm™).²³

4.4.1.2 DERMIS DESEPITELIZADA (DED)

La dermis desepitelizada es un preparado de piel de espesor dividido por la remoción de fibroblastos dérmicos y epidérmicos derivados de la dermis, utilizada ampliamente en la preparación de composites de epidermis y dermis

humana, y para la reconstrucción in vitro de la mucosa epitelial del paladar duro humano (Figura 11).²²

La mucosa desepitelizada lingual bovina ha sido también utilizada como sustrato para cultivo de queratinocitos.

Las ventajas son su buena durabilidad y antigenicidad reducida; habilidad para retener sus propiedades estructurales, aún después de ser congelada en el proceso de liofilización; y la posibilidad de ser conservada en glicerol.²⁴

Sin embargo, los exámenes cercanos a los equivalentes a la mucosa basados en la DED han revelado una infiltración de fibroblastos muy limitada en este andamio al compararla con la mucosa oral normal.²⁴

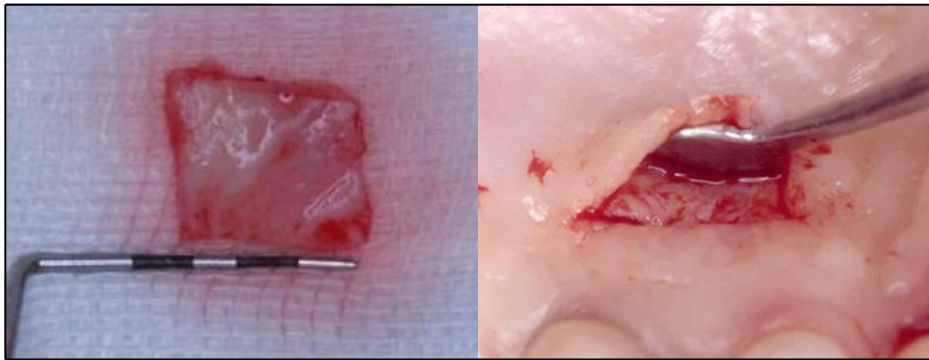


Figura 11. Sitio donante de dermis desepitelizada.²⁵

4.4.1.3 MEMBRANA AMNIÓTICA

Los resultados obtenidos con membranas amnióticas han propiciado su uso en las diferentes especialidades. Una de las barreras más importantes que se debe asegurar es el riesgo de transmitir enfermedades de donante a paciente. Es una capa interna de la membrana placentaria, la membrana amniótica es una membrana resistente, transparente, delgada y rica en

colágeno que reviste la lámina coriónica y la placenta, en el período del desarrollo fetal, muy similar a la piel (Figura 12).²⁶

La membrana amniótica puede ser utilizada como un sustrato para el cultivo de células epiteliales orales. Se ocupa también para la reconstrucción de tejido ocular. Nakamura y colaboradores desarrollaron una matriz de ingeniería tisular con base a esta membrana para generar epitelio oral con un gran número de desmosomas contenidas y unidas a una membrana basal mediante hemidesmosomas. En su modelo, las células del epitelio eran capaces de crear queratina, provee un sustrato sano adecuado para repitelización.²¹

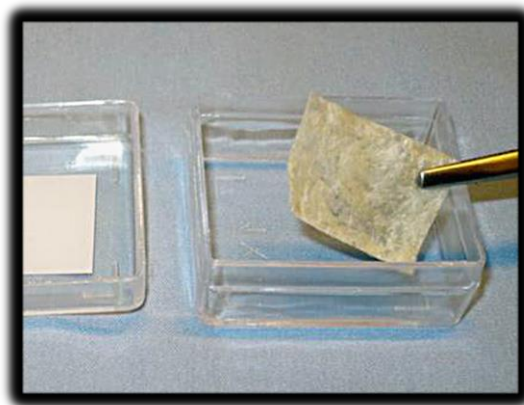


Figura 11. Membrana amniótica liofilizada ²⁶

4.4.1.4 BASADOS EN GELATINA

Los geles son una clase de biomateriales que tienen gran potencial de andamiaje en la aplicación de la ingeniería de tejidos debido a su alto contenido de agua, biocompatibilidad, propiedades mecánicas similares a las del tejido blando, eficiente transporte de nutrientes y su biodegradación, así

como la habilidad de encapsular células y ser inyectadas como líquido de gel in situ.²⁷

Las matrices de gelatina-glucan, gelatina-hialurano y gelatina-quitosano-ácido hialurónico, gelatina-quitosano-alcohol polivinílico han sido desarrollados para la ingeniería de tejidos de piel (Figura 17). La forma desnaturalizada de la colágena gelatina es no antigénica, atrayente de fibroblastos el cual es un activador de macrófagos; además esta promueve la epitelización y la formación de tejido de granulación y se añade ácido hialurónico para mejorar las propiedades.¹⁹

Los hidrogeles pueden ser utilizados como andamios inyectables, fácilmente pueden llenar los defectos de cualquier tamaño y forma y se pueden implantar de una manera mínimamente invasiva. Apoyan el transporte de nutrientes y residuos, y pueden suspender homogéneamente las células en un entorno 3D, donde las células encapsuladas suelen mantener una morfología redondeada que puede inducir un fenotipo, capaces de realizar la transducción de cargas mecánicas, para ejercer control de las fuerzas que actúan sobre las células encapsuladas, de manera similar a las condiciones fisiológicas. La viabilidad de los condrocitos auriculares es superior al 81% después de ser cultivados sobre un hidrogel.²⁸



Figura 17. Condrocitos cultivados sobre un andamio de hidrogel a base de quitosano/alcohol polivinílico.²⁸

4.4.1.5 BASADOS EN FIBRINA

El polímero de la fibrina está formado por estructuras estables que facilitan la polimerización de la colágena producida por los fibroblastos.²⁷

La matriz de fibrina ha sido usada para la construcción in vitro de cartílago humano, piel y hueso. El Bioseed™, es un sustituto de piel, compuesto por sellador de fibrina con queratinocitos autólogos humanos cultivados, la matriz de pegamento de fibrina proporciona suficiente estabilidad adherente a los queratinocitos injertados en estado de proliferación activa.¹⁹

La fibrina puede ser preparada de plasma autólogo y su uso puede ser agrupado en tres áreas: hemostasia, adherencia y acción antibacterial; también como andamio biológico para células troncales en regeneración de hueso, cartílago, tejido nervioso, piel, tendones y ligamentos (Figura 18).¹⁹

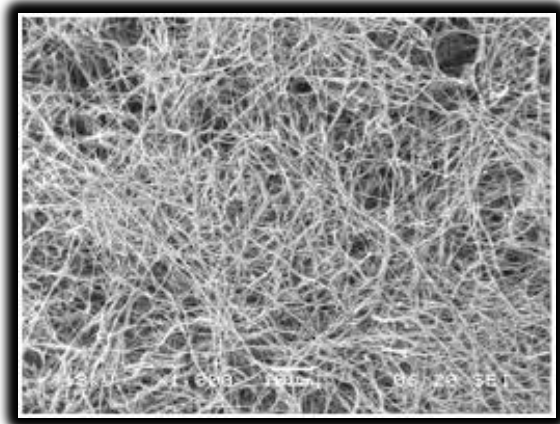


Figura 18. Microscopia electrónica de barrido de un gel de fibrina.²⁷

4.4.1.6 SUSTITUTOS DE PIEL CON FIBROBLASTOS

Los sustitutos dérmicos son un tratamiento eficaz para los procesos que destruyen la piel como las quemaduras que involucran el 60% o más de la superficie corporal total, traumatismos y enfermedades genéticas que involucran heridas crónicas.²⁹

Existen sustitutos de piel cultivados que se componen de un injerto autólogo en el cual están cultivados queratinocitos epidérmicos como un componente de colágeno y un sustrato de gluconaminoglucano impregnado con fibroblastos autólogos como un componente dérmico, teniendo como base una matriz de colágeno (Figura 19).²¹

El uso de autoinjertos de otras partes sanas de la piel es el tratamiento más utilizado para sustituir la piel perdida.

Dermagraft®. Es un sustituto dérmico derivado del cultivo de fibroblastos humanos donado del prepucio de neonatales. Los fibroblastos proliferan para rellenar los intersticios del andamio y secretan colágena dérmica humana para crear un sustituto dérmico tridimensional con células vivas y metabólicamente activas.¹⁹

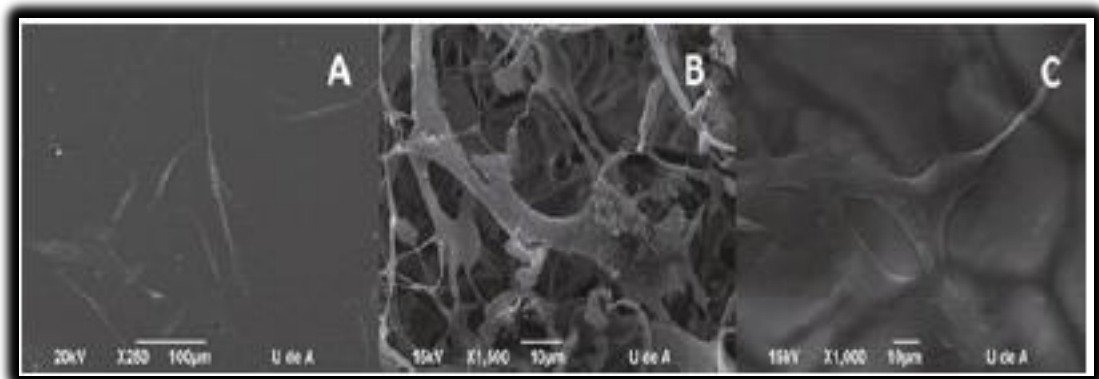


Figura 19. Fibroblastos adheridos en platos de cultivo y matrices Col. (A) Morfología de fibroblastos cultivados en monocapa. (B) Fibroblastos adheridos a la superficie porosa de matriz de colágeno. (C) Fibroblastos adheridos a superficie lisa de matriz de colágeno. 28

4.4.1.7 POLÍMEROS

Las membranas de policarbonatos permeables están disponibles comercialmente y son usadas en modelos epiteliales de espesor parcial. El uso exitoso de un co-polímero biodegradable segmentado de PEGT/PBT en la ingeniería de tejidos de piel ha sido reportado. Este andamio sintético tiene buenas propiedades mecánicas, y no tiene riesgo de transmisión de enfermedades.³⁰

Los polímeros sintéticos biodegradables se preparan mediante reacciones químicas de polimerización y por ello es posible, en cierto grado, controlar su peso molecular y su polidispersidad (Figura 20). Esto les confiere un rango más amplio de propiedades que el existente en los naturales y los hace más predecibles y reproducibles. La degradación de los polímeros sintéticos tiene lugar principalmente mediante hidrólisis, lo cual hace más controlable su velocidad de degradación al no verse involucrados ciclos enzimáticos en el proceso.¹⁹



Figura 20. Andamio sintético para piel (InbiodermC)³¹

Los materiales poliméricos tienen una amplia variedad de aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos, ya que presentan propiedades físico-

químicas más cercanas a la de los tejidos vivos, que en su mayor parte están formados por polímeros naturales, también conocidos como biopolímeros, como son las proteínas y los polisacáridos.³²

Actualmente existe la tendencia de usar biopolímeros, en la formulación de materiales para fines periodontales, maxilofaciales y en la ingeniería de tejidos óseos.³² (Figura. 21)

El éxito de estos materiales se basa en su alta biocompatibilidad y sus efectos biológicos positivos después de su implantación; estos biovidrios se unen e integran al hueso del cuerpo sin la formación de una cápsula fibrosa evitando así la inflamación y la toxicidad. Esta unión ósea es promovida por la formación de una capa de fosfato de calcio sobre la superficie del vidrio que evoluciona en apatita de hidrogenocarbonato cuando está en contacto con fluidos fisiológicos.³²

La aplicación de estos biovidrios es prometedora en la formación de andamios tridimensionales con agentes osteogénicos.³² (Figura 22).

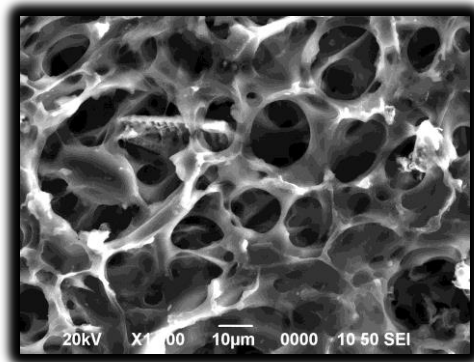


Figura 21. Microscopia electrónica de barrido de un andamio de polímero biodegradable.³³

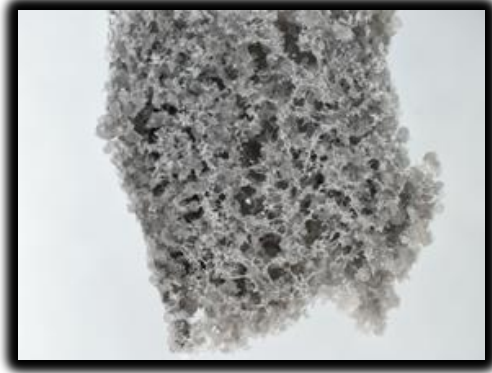


Figura 22. Microscopia de un biovidrio ³³

4.4.1.8 ÁCIDO GLICOLIPOLILÁCTICO

El andamio de ácido glicolicopoliláctico poroso también ha sido usado para construir un revestimiento de mucosa en una prótesis mucosa con ingeniería de tejidos para reemplazar defectos en la tráquea. Un andamio dérmico compuesto por una malla de tejido de ácido poliglicólico y policaprolactona (Figura 23).³⁴

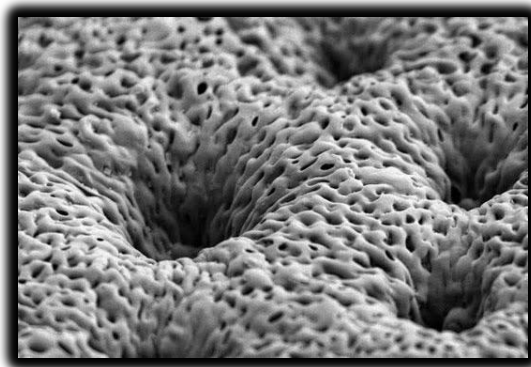


Figura 23. Micrografía electrónica de un andamio de PLGA ³⁵

Estos andamios son polímeros de poly (L-lactide-co-e-caprolactona) (LCL) y el ácido poliglicólico también han sido utilizados para la ingeniería de tejidos de periostio para nueva formación de hueso.

Las mallas más comúnmente utilizadas son las hechas de poli (á-hidroxi-ésteres). Estas mallas se utilizan para la regeneración del cartílago e incluyen el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), y sus copolímeros (PLGA). Las mallas sin tejer tienen alto volumen vacío y las superficies están bien adaptadas para la regeneración del tejido, mientras que las mallas tejidas presentan mayor resistencia y pueden ser hechas en un amplio rango de porosidades.³⁶

En general, en estas formas prefabricadas se pueden cultivar células gracias a que los andamios son mecánicamente estables y luego pueden ser implantados *in vivo* para una reparación completa.

El ácido poliláctico ha demostrado ser biocompatible, es seguro en humanos y se degrada más lentamente en ácido poliglicólico. (Figura 24).³⁶



Figura 24. Micrografía electrónica de barrido de una, poli nanoestructura porosa (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) de la membrana.³⁷

4.4.2 ANDAMIOS PARA TEJIDOS DUROS

El enfoque clásico de la ingeniería de tejidos en la regeneración craneofacial en los últimos 30 años ha sido el uso de andamios naturales o sintéticos para reparar o regenerar defectos periodontales y maxilofaciales.

El empleo de diferentes andamios para regeneración ósea ha perdurado hasta nuestros días a pesar de las limitaciones, riesgos quirúrgicos y de salud asociados a éstos. La complejidad en la arquitectura y la variabilidad de las propiedades del tejido óseo; porosidad, tamaño de poro, propiedades mecánicas, la mineralización o la densidad mineral, tipo de células, entre otras. Por esta razón, a través de los últimos años se ha trabajado intensamente en el desarrollo de materiales o dispositivos con características adecuadas que permitan disminuir, y en algunas ocasiones eliminar, el uso del injerto.³⁸

En medicina y odontología se utilizan una gran cantidad de sustancias y dispositivos médicos para la sustitución de tejido vivo. En particular, los materiales bioactivos y sus aplicaciones han tenido un desarrollo creciente en los últimos años. Cuando es necesario restaurar un defecto óseo, el hueso autólogo continúa empleándose como auto injerto en la cirugía reconstructiva.³⁸

Una de las soluciones a estas afecciones es el empleo de sustitutos óseos, ya sea para reemplazar el tejido afectado o para favorecer su regeneración.³² En las últimas décadas se desarrollaron biomateriales para cumplir requerimientos específicos en diferentes aplicaciones clínicas.

En este sentido los órganos o tejidos descelularizados pueden servir como fuente de MEC para ingeniería de tejidos. El alto grado de conservación evolutiva de muchos de los componentes de la MEC permite el uso de andamios naturales.³⁸

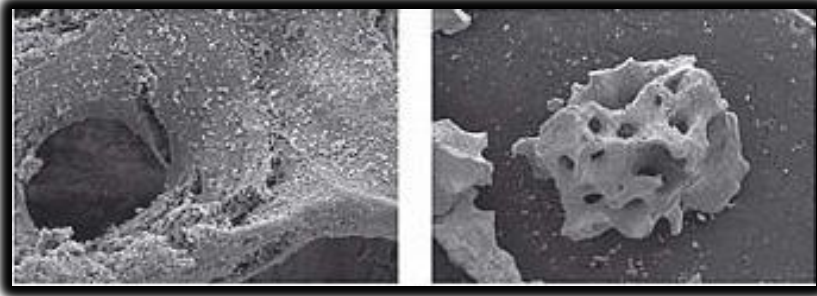


Figura 25. Material óseo de origen bovino para regeneración de tejidos³⁹

4.4.2.1 A BASE DE COLÁGENA

Los distintos tipos de colágena dependiendo de su correspondiente secuencia peptídica muestran diversos patrones de polimerización formando distintos arreglos que son su forma funcional en el tejido.

Los andamios basados en colágena se dividen en dos categorías; andamios de colágena pura y andamios de colágena compuesta.

Como andamio, la matriz de colágena es biocompatible y se utiliza en periodoncia para proteger injertos óseos para la regeneración de tejido sin tener invasión de células epiteliales.⁴⁰

Masuda y colaboradores en 1996, desarrollaron el primer modelo in vitro de mucosa de espesor total cultivando queratinocitos gingivales normales en geles de colágena de piel bovina (CCG) que contenían fibroblastos, y co-cultivando en un medio de reconstrucción en una interfase aerolíquida por 10 días. El resultado fue un modelo de mucosa bien diferenciado.⁴⁰

Moriyama y colaboradores modificaron este método y desarrollaron un composite de mucosa oral cultivado utilizando una esponja de matriz alo péptica de colágena tipo I con CGC. Su modelo de mucosa estaba compuesto por una lámina propia, en el cual fueron embebidos los fibroblastos en CGC, y una esponja de colágena con estructura de panal y capas de células del epitelio estratificado en la superficie de la lámina propia cultivada. El resultado positivo fue que el gel de colágena da soporte a los fibroblastos, el cual provee un sustrato adecuado para la formación de multicapas de queratinocitos y prevé la invasión de células epiteliales y formación de islas en la capa del tejido conectivo (Figura 26).⁴⁰

Un avance en los andamios de la ingeniería de tejidos fue la introducción de matrices basadas en colágena compuesta. Tales como andamios con quitosano, elastina y glucosaminoglucano (GAG).⁴¹

El quitosano funciona como un puente para incrementar la eficiencia reticular del glutaraldehído debido a la larga cadena de grupos amino. Los GAGs son elementos esenciales en la matriz extracelular, compuestos por polímeros largos no ramificados de unidades repetidas de disacáridos.¹⁹

El cartílago de tiburón, la tráquea bovina y los cartílagos porcinos son unas de las posibles fuentes de GAGs. Algunos tales como el condroitin sulfato y el ácido hialurónico son hidrofílicos, los cuales atraen una gran cantidad de agua y de esta manera forman geles hidratados, permitiendo que las moléculas hidrosolubles se difundan rápidamente.⁴⁰

Los fibroblastos cultivados dentro de una esponja de CGC expresan una síntesis de colágena significativamente incrementada, comparada con la de los fibroblastos cuando estos son cultivados en un gel de colágena (Figura 27) y cuando se cultivan fibroblastos de una sola capa.⁴¹



Figura 26. Andamio de colágena tipo I. ⁴²

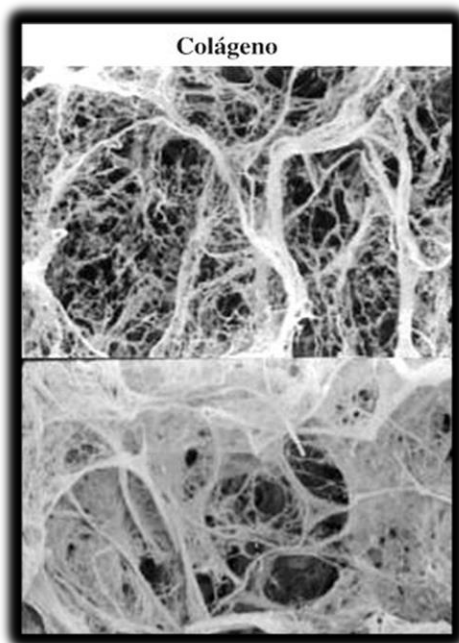


Figura 27. Micrografía de andamio de gel de colágena con crecimiento de fibroblastos. ⁴²

4.4.2.2 A BASE DE QUITOSANO

Biopolímero hidrofílico obtenido de la quitina. Químicamente similar a la celulosa, un polisacárido abundante encontrado en el exoesqueleto de los crustáceos.

A sido recomendado como un andamio adecuado para la regeneración tisular por su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, si no antigenicidad y sus propiedades de absorción.³²

Recientemente se ha prestado mucha atención a la utilización del quitosan en aplicaciones biomédicas, por ejemplo, en la cicatrización de heridas, como material para recubrimiento de heridas o quemaduras, agente mucoadhesivo y hemostático, membrana para hemodiálisis y sistema para transporte de sustancias activas.⁴³

Materiales basados en quitosan y GAG, principalmente de quitosana y sulfato de condroitina, han mostrado buena citocompatibilidad en la regeneración ósea y se han utilizado como componentes de piel artificial para el tratamiento de lesiones dérmicas. Estudios comparativos de diferentes materiales compuestos por quitosan y alginato, por una parte, y el poliácido láctico (PLA) (Figura 28) por la otra, destinados a la ingeniería de tejidos articulares, demostraron que el quitosan incrementa la adhesión y proliferación celular in vitro, así como la actividad biosintética en relación con el alginato y el PLA (Figura 29).³⁰

Promueve la curación de heridas e induce a la formación ósea.

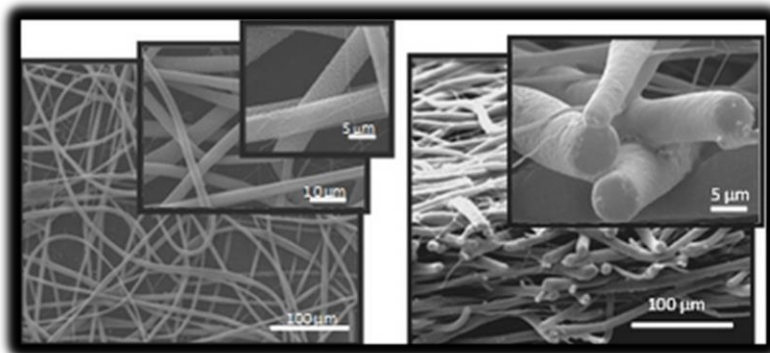


Figura 28. Andamio a partir de una solución poli(ácido láctico) (PLA) ³⁶

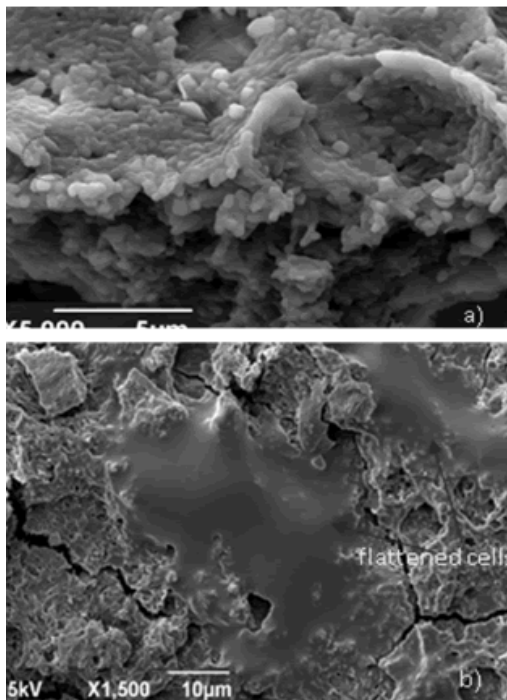


Figura 29. Andamio de PLA-PLG-quitosano ³⁰

En sus modificaciones con hidroxiapatita han sido ampliamente investigados como un material para andamios en aplicaciones de la ingeniería de tejidos. Ha sido ampliamente demostrado su carácter biocompatible y biodegradable, ya que promueve la adhesión celular y se reabsorbe mediante procesos de

hidrólisis a través de la acción de enzimas presentes en los fluidos fisiológicos.³²

El quitosano puede considerarse como análogo estructural de los glucosaminoglicano, los cuales son polisacáridos aniónicos que generalmente se encuentran unidos mediante interacciones electrostáticas a proteínas, formando los proteoglicanos. Estos últimos desempeñan una función importante en la organización y función de la matriz extracelular de los tejidos humanos.³²

Materiales basados en quitosano y GAG, principalmente de quitosano y sulfato de condroitina, han mostrado buena citocompatibilidad en la regeneración ósea, se han empleado con éxito en la reparación de cartílagos.

La biodegradabilidad del quitosano es otro factor esencial que debe tenerse en cuenta para la selección adecuada de biopolímeros para ingeniería de tejidos.³²

Entre las técnicas de preparación de los composites, el método de mezclado de hidroxiapatita con quitosano, es de los más empleados para obtener matrices tridimensionales en la ingeniería de tejidos. (Figura30)³²

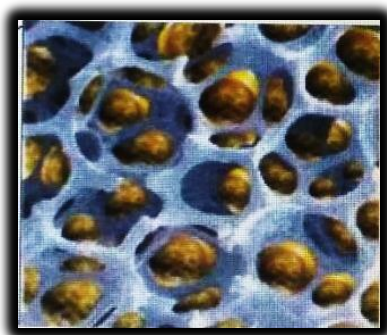


Figura 30. Proceso de colonización de osteoblastos en andamio de hidroxiapatita con quitosano.³²

4.4.2.3 ALOPLÁSTICOS

Estos materiales son biológicamente aceptables como sustitutos óseos, debido a que permiten remodelación y crecimiento óseo. Su gran ventaja es que no requieren de un sitio donador y no existe riesgo de transmisión de infecciones. Estos sustitutos incluyen cerámicas tales como; polímeros biocompatibles, fosfato tricálcico, hidroxiapatita.³²

4.4.2.3.1 BIOCERÁMICAS

El desarrollo de las biocerámicas basadas en fosfatos de calcio con vistas a su aplicación en la clínica, comenzó en la década de los años 70 del siglo XX, El estudio de las cerámicas fosfato-cálcicas se ha centrado en los compuestos fundamentalmente de la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico.³²

El fosfato tricálcico (FTC) es una forma porosa del fosfato de calcio. Este material posee una proporción de calcio-fosfato de 1:5; a nivel mineralógico es una whitlockita. El comportamiento bioactivo, su no toxicidad y su biocompatibilidad llevan al fosfato tricálcico a una unión fisicoquímica íntima con el hueso.³²

Además de proveer un andamio para la nueva formación de hueso, dando soporte a la adhesión previniendo que el tejido blando colapse al sitio de la herida y proliferación de fibroblastos gracias a su osteoconductividad. (Figura 31).⁴⁴

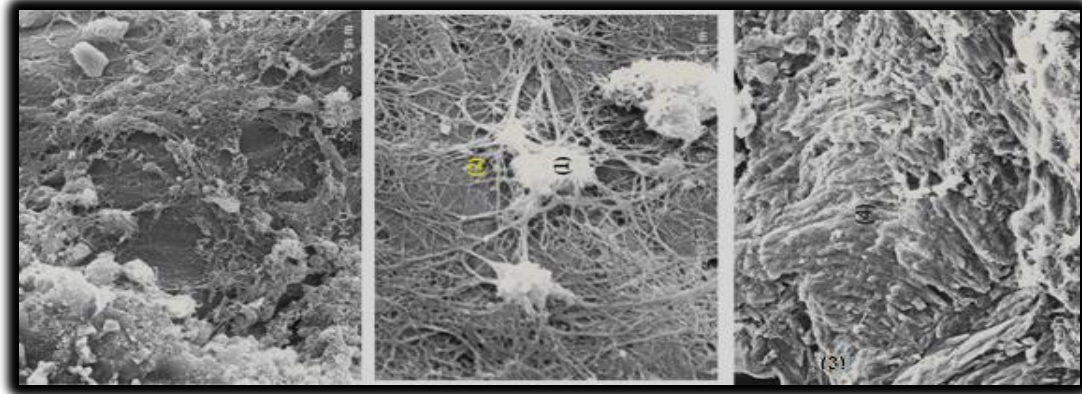


Figura 31. Micrografía donde se muestra la reabsorción de fosfato tricálcico, durante 45 días. ⁴⁴

Al ser utilizado biológicamente como relleno óseo, es parcialmente reabsorbible y permite ser sustituido por hueso. La matriz cerámica del FTC, al ser colocado en estrecha aposición con el hueso vital, sirve como canal para la formación inicial de tejido óseo, que posteriormente es seguida por la reabsorción del material y la formación completa de hueso.³²

Estos materiales de relleno están elaborados con β -Fosfato Tricálcico. Son por tanto, productos bioactivos, osteointegrables y reabsorbibles. En medio fisiológico reaccionan superficialmente con el medio, disolviéndose lentamente, y proporcionando iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} lo que da lugar a la precipitación de hidroxiapatita en la superficie del implante. Esta precipitación produce una interfase de algunas micras de espesor en la que aparecen fibras de colágeno, osteoblastos y hueso inmaduro, de aspecto más o menos amorfo, que posteriormente madurará y se estructurará mientras que la disolución del implante progresa hacia el interior del mismo dando, como resultado final, la sustitución del hueso.³²

El Sulfato de Calcio (CaS), mencionado anteriormente representa uno de los biomateriales más antiguamente conocidos, y es uno de los primeros sustitutos óseos utilizados en la ortopedia y en la odontología. Entre los usos del CaS se encuentran: los defectos periodontales, la cirugía endodóntica, el levantamiento del seno maxilar, el tratamiento de las fenestraciones y las deshicencias, y como una membrana o barrera.³²

Varios investigadores coinciden en que el uso del CaS como injerto óseo, es efectivo en la regeneración de grandes defectos óseos, que involucran o no ambas corticales; mejorando los resultados clínicos.

La hidroxiapatita es una biocerámica que tiene propiedades osteoconductoras y que se adhiere estrechamente con el hueso. Este material es comúnmente utilizado en la ingeniería de tejidos en combinación con polímeros para mejorar sus propiedades mecánicas, al ser compatible con la apatita natural proporciona un buen entrelazamiento con el tejido huésped (Figura 32).⁴⁵

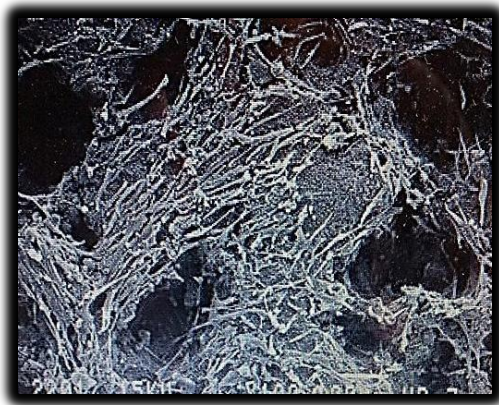


Figura 32. Crecimiento in vitro de osteoblastos humanos sobre cerámica porosa de hidroxiapatita⁴⁶

Los composites de fosfatos de calcio con matrices de quitosano fueron ampliamente investigados para propósitos estructurales, específicamente

para la cirugía ortopédica y maxilofacial, ya fuera para rellenos de defectos óseos, aumentos del reborde alveolar, implantes del oído medio, fusiones de vértebras de la columna o para el recubrimiento de prótesis metálicas, con ellos se logra una adecuada integración relleno-matriz.³²

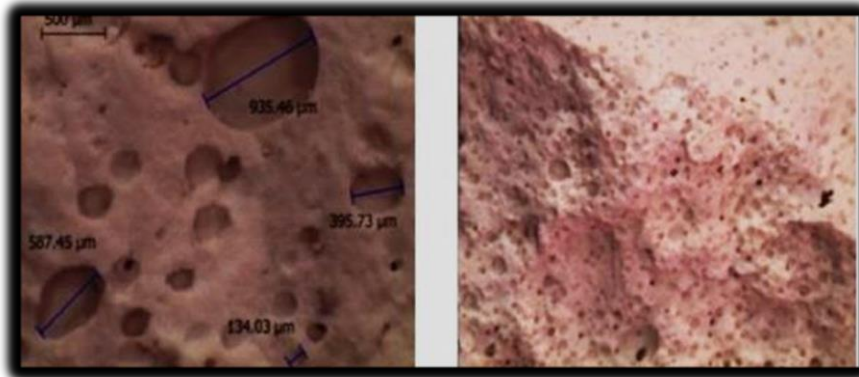


Figura 33. Imágenes de andamios de hidroxiapatita tomados del microscopio estereoscópico.³⁸

5. APLICACIONES EN LOS AVANCES DE LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

Yao y colaboradores determinaron que andamios fibrosos compuestos de gelatina/PCL mediante electrospun con la relación de mezcla de 2: 1 era un candidato superior para andamios para aplicaciones de ingeniería de tejidos.⁴⁷

J A, Kuttappan S, y col., emplearon el plasma rico en plaquetas (PRP) en nano-andamio de gelatina e hidroxiapatita como un potencial candidato para aplicaciones de ingeniería de tejido óseo.⁴⁸

Feng B, y col., estudiaron un andamio de gelatina (GT) y policaprolactona (PCL) para mostrar que la falta de homogeneidad morfológica y de composición del andamio tenía una notable influencia sobre la adhesión y proliferación celular. Este estudio pone de relieve la importancia de producir nanofibras compuestas morfológicamente uniformes y homogéneas en su composición.⁴⁹

Lotfi M y col., desarrollaron un nano andamio de material compuesto de microfibras, fabricado a partir de una mezcla de quitosano- β -glicerol fosfato-gelatina (quitosano-GP-gelatina), el cual es un biomaterial biológicamente compatible con potencial para servir como una plataforma adecuada para la retención de las células cultivadas tridimensionalmente en ingeniería tejidos.⁴⁰

Lee JB, y col., demostraron que andamios en gelatina de poli ácido L-láctico (PLLA) y simvastatina (SIM), promueven significativamente la actividad de mineralización, la expresión génica osteogénica, y la regeneración ósea. Esto sugiere la aplicación potencial de este material hacia ingeniería de tejido óseo.⁵⁰

Thiem A, y col., utilizaron un andamio de material compuesto de Gelatina-poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA), como una plantilla para la regeneración del cartílago articular. Los andamios mostraron un excelente desempeño funcional y alta biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo*. Estos andamios de gelatina-PLGA puedan apoyar efectivamente la condrogénesis *in vivo* que demuestra un gran potencial para el uso en el tratamiento de defectos del cartílago.⁵¹

Kim IG, y col., fabricaron andamios de poli L-lactida-co-glicolida (PLGA) y poli L-lactida (PLLA) con matriz derivada de fibroblastos de pulmón humanos (hFDM) cultivados *in vitro* (WI-38). Esos andamios fueron luego conjugados con heparina y posteriormente inmovilizadas con factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF) para regenerar cartílago. Su estudio demuestra el efecto positivo de hFDM en la condrogénesis de las MSC y la reparación del cartílago.⁵²

Haider A, y col., generaron un andamio artificial para imitar las características de la matriz extracelular en el nivel de nanoescala para activar el crecimiento de células osteoblásticas. Para este propósito, emplearon la proteína morfogénica ósea (BMP-2) sobre una superficie de hidroxiapatita modificada con ácido L-glutámico en nanofibras. Sus resultados indican que el andamio híbrido de nanofibras se puede utilizar como un portador de nanodroga para el suministro controlado y selectivo de BMP-2, que abrirá nuevas posibilidades para mejorar la regeneración del tejido óseo y ayudará en el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con los huesos en el futuro.⁵³

Fisher MB, y col., demostraron que las células madre mesenquimales (MSCs) incruadas en un hidrogel de ácido hialurónico (HA) y expuestas a factores condrogénicas (factor de crecimiento transformante- β 3 [TGF- β 3]) producen un tejido parecido a cartílago *in vitro*.⁵⁴

Deepthi S, y col., sintetizaron un andamio de macroporos de quitina y poli (caprolactona) (PCL) con nanopartículas de la transformación del factor de crecimiento β (TGF- β) de liberación prolongada para la regeneración del cartílago.⁵⁵

Park JY, y col., emplearon un andamio obtenido mediante impresión 3D en conjunto con células sembradas (CPS), y fue implantado para la reconstrucción auricular en conejos.⁵⁶

Kozin ED, y col., emplearon andamios para el injerto de una membrana timpánica (TM) con filamentos circunferenciales y radiales fabricados por impresión en 3D de polidimetilsiloxano (PDMS), ácido flex-poliláctico (PLA) y la policaprolactona (PCL) en conjunto con un hidrogel compuesto de fibrina-colágeno. Los injertos impresos en 3D poseen propiedades mecánicas que muestran una mayor resistencia a la deformación.⁵⁷

6. CONCLUSIONES

Este trabajo ha explorado y dado a conocer ampliamente la aplicación de distintos fenotipos celulares, moléculas y materiales biomiméticos que comprenden la triada de la ingeniería de tejidos, para la reparación y/o regeneración de las estructuras que comprende el complejo craneofacial.

Existe una gran variedad de moléculas de señalización específicas que pueden actuar sobre diferentes tipos celulares que aún requieren elucidar el mecanismo por el cual desempeñan sus funciones para poder entender y controlar su aplicación en la ingeniería de tejidos.

El diseño del andamio ideal para la formación de cada tejido es un reto, ya que cada uno tiene un alto grado de complejidad en su especialización. Lo ideal sería que se reabsorba una vez que ha servido su propósito de proporcionar una plantilla para regeneración de tejidos. Es importante destacar que la degradación debe producirse a un ritmo compatible con la formación de tejido nuevo.

Los composites basados en polímeros naturales con moléculas de señalización, han permitido obtener materiales con un mejor y más adecuado diseño, con una fortaleza incrementada y superior osteoconductividad, bioactividad, biodegradabilidad y homogeneidad dando similitud al tejido que se desea reparar o sustituir, en comparación con los biomateriales que le preceden. La tendencia actual es a desarrollar andamiajes tridimensionales de compuestos con propiedades incrementadas, a partir de materiales inorgánicos con mayor biodegradabilidad y bioactividad para obtener una adecuada proliferación celular y una más rápida y eficiente formación y mineralización del tejido dañado.

A la fecha, los tejidos intraorales y extraorales derivados de células progenitoras se han utilizado para la ingeniería de tejidos en estudios con animales pequeños y grandes para evaluar su potencial en aplicaciones preclínicas. Existe una gran cantidad de evidencia para apoyar la noción de que las MSC se pueden utilizar para regeneración y no solo en el ámbito odontológico.

7. GLOSARIO

Regeneración

Se entiende como regeneración al restablecimiento de la arquitectura y función tisulares después de una lesión en dicho tejido que posee propiedades indistinguibles del tejido original.⁵

Reparación

Si los tejidos lesionados son incapaces de un restablecimiento completo, o si las estructuras de soporte del tejido han resultado seriamente dañadas, la reparación se produce depositando tejido conjuntivo (fibroso) proceso denominado cicatrización que da lugar a la formación de una cicatriz.⁵

El problema con el tejido de cicatrización es que no recupera todas sus propiedades mecánicas ni la función fisiológica del tejido u órgano original que ha sido dañado.

Por tanto, lo que interesa no es reparar sino regenerar, esto implica reconstruir la forma y la función.⁵

Remodelación

Aunque aparentemente el hueso maduro no presenta cambios macroscópicos, dentro de la matriz ósea hay un constante cambio para permitir la renovación de hueso viejo y su reemplazo por hueso nuevo; proceso conocido como remodelación.⁵

Osteogénesis

Es el proceso de formación y desarrollo de hueso nuevo. Un material osteogénico se deriva o bien está formado por tejido implicado en el

crecimiento y reparación, un ejemplo el hueso autólogo. Las células osteogénicas pueden promover el crecimiento óseo, incluso en otros tejidos.⁵

Osteoinducción

Es el proceso de estimulación de la osteogénesis. Los materiales osteoinductivos se pueden utilizar para mejorar la regeneración ósea, y el hueso puede crecer o extenderse por una zona donde normalmente no se encuentra. La regeneración ósea estimulada por la liberación de proteínas inductivas que facilitan la diferenciación celular.⁵

Osteoconducción

Proporciona la estructura o matriz física apropiada para la deposición de hueso nuevo. Los materiales osteoconductivos son guías para el crecimiento óseo y permite que se deposite hueso nuevo. El proceso de reparación ósea se produce a partir de células osteoprogenitoras del propio huésped. Se crea una estructura para que se pueda formar hueso por sustitución progresiva. La reabsorción será lenta (dependiendo del biomaterial y del lecho receptor) y progresiva.⁵

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vacanti Ch. 2006. "The History of Tissue Engineering". J. Cell. Mol. Med. 10 (07/2006) : 569-576.
2. Rosáles-Ibañez, Ojeda-Gutiérrez, Alvarado-Estrada. Ingeniería Tisular en Odontología. Rev ADM 2012;69(4):164-167.
3. Gorka Orive, Rosa M. Hernández, Alicia R. Garcón, Manoli Igartúa, José L Pedráz M. Tissue Engineering: Progress and challenges. VITAE, Rev de la Facultad de Química Farmacéutica 2008;10(2):46-51.
4. Ross. Pawlina. Histología y Atlas color Biología Celular y Molecular. 5ª Edición, editorial Medica Panamericana 2009. Pp 335-364.
5. Mendoza Cardona A. Factores de crecimiento derivados en plaquetas en plasma rico en plaquetas. 2a.ed. España: Editorial Elsevier, 2009 pp.24-58.
6. Ma. E. Gómez de Ferraris, A. campos Muñoz. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. 3ª edición. Editorial Medica Panamericana 2009. pp 315-326.
7. Palma Cortés Roberto Benito, Valdez S, Robles Casolco Said. Tissue engineering. J Research and Innovation Graduate School13(6)19-27, Nov 2012.
8. Claudia Mera Reina, Angélica Roa Lara y Sandra Ramírez Clavijo. Hematopoietic stem cells, overview and pathways implied on their self-renewal mechanisms Rev. Cienc. Salud. Bogotá (Colombia) 5 (1): 67-89, abril-junio de 2011.

9. Francisco P. Chávez. "Logran expandir en cultivo las células madre de la médula ósea. Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Universidad de Chile BioBlogia, September 2011.
10. Parra M. Epigenética de la transdiferenciación y reprogramación celular. J SEBBM 2015;41(2):29-33.
11. Hadenfeld Manal, Peitz Michael, Pusch Annette, Bruestle Oliver. Reprogrammed stem cells: an interactive timeline. J EuroStepCell. September 2015.
12. Francisca Pulido, Juan Garrido, Ingrid Garzón BMP-2 in Traumatology. Advances in Tissue Engineering. Med. 2013; 98: (790): 154-159.
13. Seyhan Ege. Química Orgánica Estructura y Reactividad Tomo 2. 2a edición. Editorial Reverté 2009. Pp1195-1202.
14. Tatman PD, Muhonen EG, Wickers ST, Gee AO, Kim ES, Kim DH. "Self-assembling peptides for stem cell and tissue engineering." Biomater Sci. 2016 Apr 22;4(4):543-54.
15. Juana Mulero Cánovas, Pilar Zafrilla Renteroa, Adela Martínez-Cachá Martínez a, Mariano Leal Hernández b y José Abellán Alemán Péptidos bioactivos REV Clin Invest Arterioscl. 2011;23(5):219---227.
16. Wayne M. Becker, Lewis J. Kleinsmith, Jeff Hardin. El mundo de la célula. 6ª Edición, editorial Pearson Educación, 2006. Pp 429-534
17. Alberts Bruce, Bray Dennis. "Biología molecular de la célula". Barcelona. Ediciones Omega. Cuarta Edición. 2008; 1067-1072.

18. Ricardo Armentano. Innovación en Biomecánica orientada a la ingeniería de tejidos. 1ª Edición, editorial EAE, 2012. Pp 47-62
19. Chan B, Leong K. "Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations." Eur Spine J 2008;17(4):s467-S479.
20. Fernando Guzmán. ANDAMIOS CELULARES PARA REPARAR TEJIDOS DAÑADOS. Gaceta.unam/20150112. Enero 2015 Num.4660
21. Deboosere E. "Tissue engineering van de orale mucosa; analyse van "engineering" technieken, toepassingsgebieden en hungerelateerde klinische "success rates". J Spine 2010:1-65.
22. Zhong S P, Zhang Y Z, Lim C T. "Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction." WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology 2011 September/October;2:510-526.
23. Guest Norbid. Implants, Soft Tissue, AlloDerm. TheHealthScience November 22, 2013 - 00:31
24. Moharamzadeh K, Book IM, Van Noort R, Scutt AM, Thotnhill MH. "Tissue-engineered Oral Mucosa: a Review of the Scientific Literature." Journal of Dental Research 2009 February;86(2):115-125.
25. Delgado J, Calvo J, Santos A. "Injerto Gingival Libre. Revisión a propósito de un caso." Rev Oper Dent Endod 2012:57
26. Karine Stipert. Grupobiotar/bancodetejidos/2015/07/02/et.al. www.biotar/bancodetejidos.com

27. Thananphum, O., Michael, L., & Rupak, R. (2011). "Microporus nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering." Science Direct. 29, 4091-4099.
28. Yaaziel Melgarejo-Ramírez; Roberto Sánchez-Sánchez; Zaira García-Carvajal; Julieta García-López; Claudia Gutiérrez-Gómez; Gabriel Luna-Barcenas; Clemente Ibarra; Cristina Velasquillo. Biocompatibility of Human Auricular Chondrocytes Cultured onto a Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Epichlorohydrin-Based Hydrogel for Tissue Engineering Application Int. J. Morphol. vol. 32 no.4 Temuco dic. 2014
29. Juliana Valencia Serna, Catalina Pineda Molina MATRIX CONSTRUCTION AS DERMAL SUBSTITUTES: POTENTIAL APPLICATION IN SKIN REGENERATION. Rev. ing. biomed. vol.7 no.13 Medellín Jan./June 2013
30. Estupiñan Hugo A., Peña Dario Y., Vásquez Custodio. OSTEOBLAST ADHESION ON SCAFFOLDS OF PLA-PLG-HYDROXYAPATITE-CHITOSAN-ZINC BY ELECTROACTIVATION. Dyna rev.fac.nac.minas vol.79 no.176 Medellín Nov./Dec. 2012
31. Gerald Serrato. Synthetic scaffold for stem cells. Rev.InbiotecMed. Oct 2013.Num.53(10).
32. Carlos Peniche, Yaimara Solís, Natalia Davidenko Raúl García. "Materiales compuestos de quitosana e hidroxiapatita " Centro de Biomateriales, Universidad de la Habana CSIC Madrid, España. 2012 No24.117-132

33. Fis.Darío Pozas Zeped.a. Laboratorio de microscopia electrónica de la Facultad de Ciencias. Universidad de Colima No. 4528;07 Ene 2012.
34. Vallet M, Ruiz E. Bioceramics: From Bone Regeneration to Cancer Nanomedicine. Review. Advanced Materials 2011;23:5177-5218
35. Giuseppe Benanti .Nuovo tessuto osseo, osteoblasti. Ingegneri Mit, Deic14.5.15
36. Idalba A. Hidalgo, Jorge Ramírez, Marcos A. Sabino, Alejandro J. Müller. OBTENCIÓN DE ESTRUCTURAS TIPO ANDAMIO DE POLI(ÁCIDO) LÁCTICO PARA BIOINGENIERÍA MEDIANTE ELECTROSPINNING. Rev. LatinAm. Metal. Mat. 2011, S3: 28-29.
37. Luis López Rojas. *Ingeniería de tejidos (crecimiento óseo)* Rev.Med Biocriss. Bogotá 2014, 22:51-55
38. Enrique Gallegos Nieto, Hugo I. Medellín Castillo, Dirk F. de Lange. “Análisis del desempeño estructural de andamios de hidroxiapatita utilizados en ingeniería tisular”. Ingenier. mecáni. tecnolog. desarroll vol.4 no.5 México sep. 2013
39. N.Marcus Solín. RedDental/Scaffolds. JMedicRedDental nov.2015 No.49:19-34.
40. Lotfi g, Shokrgozar M, Mofid R, Abbas F, Ghanavati F, Bagheban A, et al. Clinical and Histologic Evaluation of gingival Fibroblasts Seeding on a Chitosan-Based Scaffold and Its Effect on the Width of Keratinized Gingiva inDogs. J. Periodontal 2011 09/2011;82 (9):1367-1375.

41. María Cristina Piña Barba. COLÁGENA TIPO 1, CON GRAN POTENCIAL EN REPARACIÓN DE ÓRGANOS DAÑADOS. Boletín UNAM-DGCS-010 Ciudad Universitaria. Enero de 2013
42. Ramos, Mikol, Zamora, Vanessa, Rodríguez, Gerardo, Sibaja, María, Madrigal-Carballo, Sergio, Lopretti, Mary. "Three-dimensional scaffolds Sponges type based in bioconjugates collagen-chitosan as a potential biomaterial for tissue engineering applications" REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY No. 7 - 2012 - INNOTECH – 43
43. Akman A, Tigli S. Gümüsderelioglu M. Nohutcu R. bFGF-loaded HA-chitosan: A promising scaffold for periodontal tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2011 16/03/2011; 953-962.
44. Susane Lewis. LA SOLUCION A LOS DEFECTOS OSEOS Rev. Keramedica™ Enero 2015:58(12)59-62
45. Appleford M, Oh S, Oh N, Ong JL. In vivo study on hydroxyapatite scaffolds with trabecular architecture for bone repair. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2010 13/05/2010:1019-1027.
46. Meseguer-Olmo a, J Muñoz-Ruiz a, A Bernabeu-Esclapez a, M Clavel-Sainz Nolla a, D Arcos-Pérez b, M Vallet-Regí b, F López-Prats c, A Lax-Pérez a, CL Meseguer-Ortiz de Villajos. "In vitro growth kinematics of human osteoblasts on porous hydroxyapatite ceramics." Vol. 50. Núm. 03. Mayo 2006.

47. Yao R, He J, Meng G, Jiang B, Wu F. "Electrospun PCL/Gelatin composite fibrous scaffolds: mechanical properties and cellular responses." *J Biomater Sci Polym Ed.* 2016 Apr 4:1-15.
48. J A, Kuttappan S, Keyan KS, Nair MB. "Evaluation of osteoinductive and endothelial differentiation potential of Platelet-Rich Plasma incorporated Gelatin-Nanohydroxyapatite Fibrous Matrix." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2016 Jan 29.doi:10.1002/jbm.b.33605
49. Feng B, Duan H, Fu W, Cao Y, Jie Zhang W, Zhang Y. "Effect of inhomogeneity of the electrospun fibrous scaffolds of gelatin/polycaprolactone hybrid on cell proliferation." *J Biomed Mater Res A.* 2015 Feb;103(2):431-8. doi: 10.1002/jbm.a.35184. Epub 2014 Apr 9.
50. Lee JB, Kim JE, Balikov DA, Bae MS, Heo DN, Lee D, Rim HJ, Lee DW, Sung HJ, Kwon IK. "Poly(L-Lactic Acid)/Gelatin Fibrous Scaffold Loaded with Simvastatin/Beta-Cyclodextrin-Modified Hydroxyapatite Inclusion Complex for Bone Tissue Regeneration." *Macromol Biosci.* 2016 Mar 21. doi: 10.1002/mabi.201500450.
51. Thiem A, Bagheri M, Große-Siestrup C, Zehbe. "Gelatin-poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds with oriented pore channel architecture - From in vitro to in vivo testing." *R Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016 May 1;62:585-95. doi: 10.1016/j.msec.2016.02.019. Epub 2016 Feb 6.
52. Kim IG, Ko J, Lee HR, Do SH, Park K. "Mesenchymal cells condensation-inducible mesh scaffolds for cartilage tissue

- engineering.” *Biomaterials*. 2016 Apr;85:18-29. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.048. Epub 2016 Jan 22.
53. Haider A, Kim S, Huh MW, Kang IK. “BMP-2 Grafted nHA/PLGA Hybrid Nanofiber Scaffold Stimulates Osteoblastic Cells Growth.” *Biomed Res Int*. 2015;2015:281909. doi: 10.1155/2015/281909. Epub 2015 Oct 11.
54. Fisher MB, Belkin NS, Milby AH, Henning EA, Söegaard N, Kim M, Pfeifer C, Saxena V, Dodge GR, Burdick JA, Schaer TP, Steinberg DR, Mauck RL. “Effects of Mesenchymal Stem Cell and Growth Factor Delivery on Cartilage Repair in a Mini-Pig Model.” *Cartilage*. 2016 Apr;7(2):174-84.
55. Deepthi S, Jayakumar R. “Prolonged release of TGF- β from polyelectrolyte nanoparticle loaded macroporous chitin-poly(caprolactone) scaffold for chondrogenesis.” *Int J Biol Macromol*. 2016 Mar 31. pii: S0141-8130(16)30302-6. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.03.068.
56. Park JY, Choi YJ, Shim JH, Park JH, Cho DW. “Development of a 3D cell printed structure as an alternative to autologs cartilage for auricular reconstruction.” *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Feb 28. doi: 10.1002/jbm.b.33639.
57. Kozin ED, Black NL, Cheng JT, Cotler MJ, McKenna MJ, Lee DJ, Lewis JA, Rosowski JJ, Remenschneider AK. “Design, fabrication, and in vitro testing of novel three-dimensionally printed tympanic membrane grafts.” *Hear Res*. 2016 Mar 16. pii: S0378-5955(15)30281-1. doi: 10.1016/j.heares.2016.03.005.