



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Escuela Superior de Medicina



Sección de Estudios de Postgrado e
Investigación

**Autoinjerto óseo esterilizado y reconstituido con médula ósea
autóloga: Una alternativa de reconstrucción mandibular**

Tesis

Para obtener el Grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en
Investigación Clínica

Presenta:

Dr. Martín GranadosGarcía

Asesores: Dra. Emma Verástegui Avilés Dr. Guillermo M. Ceballos Reyes.

México D.F. Diciembre del 2009

Agradecimientos:

Agradezco sinceramente a mis compañeros y amigos por su valioso apoyo en el desarrollo de este estudio.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 30 del mes de Julio del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

"Auto Injerto Óseo Esterilizado y Reconstruido con Medula Ósea Autóloga: Una Alternativa de Reconstrucción Mandibular"

Presentada por el alumno:

Granados
Apellido paterno

García
Apellido materno

Martín
Nombre(s)

Con registro:

B	0	5	1	6	5	3
---	---	---	---	---	---	---

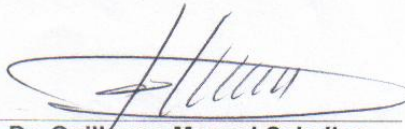
aspirante de:

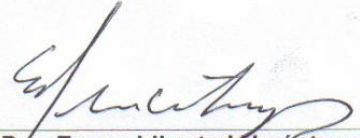
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA

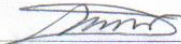
Directores de tesis


Dr. Guillermo Manuel Ceballos
Reyes

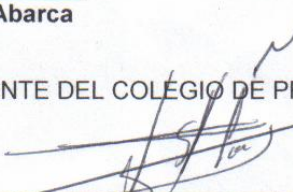

Dra. Emma Libertad Verástegui
Avilés


Dr. Juan Asbun Bojalil


Dra. María Esther Ocharán
Hernández


Dr. Jorge Eduardo Herrera Abarca

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
Y CONTROL ESCOLAR



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 30 del mes julio del año 2010, la que suscribe Granados García Martín alumno de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica con número de registro B051643 adscrito a La Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Emma Libertad Verástegui Avilés y Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes y cede los derechos del trabajo intitulado “Auto Injerto Óseo Esterilizado y Reconstituido con Medula Ósea Autóloga: una Alternativa de Reconstrucción Mandibular”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección martingranadosmx@yahoo.com.mx Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Martín Granados García

Nombre y firma

CONTENIDO

1.0 RESUMEN	4
2.0 INTRODUCCIÓN	6
2.1 El tejido óseo: componentes celulares	7
2.2 El tejido óseo: componentes minerales	9
2.3 Fisiología del hueso	9
2.4 Las células troncales	10
2.4.1 Células troncales embrionarias	10
2.4.2 Las aplicaciones de las células troncales	11
2.4.3 Las células troncales en los tejidos adultos	12
2.4.4 La lesión y las células troncales adultas	14
2.5 Anatomía de la mandíbula	25
2.6 Manejo de la mandíbula en afecciones oncológicas	28
2.7 Tipos de resección mandibular	30
2.8 Reconstrucción mandibular: injertos libres	33
2.9 Reconstrucción mandibular: colgajos libres.	33
2.9.1 Colgajo osteocutáneo de peroné microvascularizados	34
2.9.2 Colgajo osteocutáneo de cresta ilíaca microvascularizada	35
2.9.3 La necesidad de procedimientos alternativos	36
3.0 JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
4.0 OBJETIVOS	39
5.0 HIPÓTESIS	40
6.0 DISEÑO EXPERIMENTAL	41
6.1 Manejo preoperatorio	41
6.2 Procedimiento quirúrgico	41
6.3 Manejo postoperatorio	43
7.0 RESULTADOS	44
8.0 DISCUSIÓN	51
9.0 CONCLUSIONES	57
10.0 BIBLIOGRAFÍA	55

1 RESUMEN

La reconstrucción de la mandíbula representa un problema significativo debido a limitaciones en la disponibilidad de hueso donador y a los sub-óptimos resultados estéticos y funcionales obtenidos con los colgajos microvascularizados que son comúnmente utilizados.

Con el fin de intentar resolver este problema, se llevó a cabo un estudio para explorar la factibilidad de la reconstrucción ósea reciclando el hueso escindido que además fue reconstituido con médula ósea roja autóloga y hueso particulado.

A 3 perros criollos se les escindió un fragmento mandibular de 6 cm. Este fue esterilizado en autoclave por 40 minutos. Luego el hueso fue perforado cada 10 mm con perforaciones de 3 mm. En las perforaciones se introdujo hueso particulado mezclado en volúmenes iguales con médula ósea roja autóloga extraída de la espina iliaca antero superior. No se utilizaron anticoagulantes. El hueso reconstituido fue implantado debajo del músculo dorsal ancho, cuidando la hemostasia y las heridas fueron cerradas con vycril 000

Cuatro semanas después de la cirugía los perros fueron sometidos a gamagrama con 15 mCi de renio coloidal para probar la viabilidad de la médula. El estudio mostró la captación del radiofármaco en los 3 animales, lo que virtualmente demostró su viabilidad. Una hora después del estudio, el hueso fue escindido en dos perros y su estudio histopatológico corroboró la presencia y viabilidad de la médula. Ocho semanas después, el tercer perro fue sometido a un gamagrama óseo, ahora con MDP-Tc 99 lo que probó la generación de hueso nuevo.

Se demostró que el autoinjerto esterilizado y reconstituido con médula ósea se asocia a viabilidad, lo que permitiría reconstruir en forma sencilla grandes defectos óseos, incluyendo los mandibulares, esto facilitaría el manejo oncológico al propiciar resecciones más amplias, con mejor control local, y disminuyendo las preocupaciones debidas a las secuelas estéticas y funcionales.

1 ABSTRACT

Mandible reconstruction is a significant problem due to limitations in relation with availability of bone grafts and dismal esthetic and functional results with microvascular flaps.

We carried out a pilot study in order to explore the feasibility of bone reconstruction recycling the same excised bone reconstituted with autologous bone marrow and particulated bone.

Three dogs were submitted to surgery in order to resect a mandibular fragment of 6 cm. This bone was autoclaved for 40 min. Then bone was drilled with 3 mm holes every 10 mm. The holes were packed with autologous bone marrow from iliac bone and particulated bone without anticoagulants. Reconstituted bone was implanted over latissimus dorsi muscle. Wound were closed with vycril 000

Four weeks after, dogs were submitted to bone marrow scintigram with 5 mCi of colloidal rhenium. The scan showed radionuclide uptake, probing viability. One hour later, bone was excised in two of them and histopathologic study corroborated de bone marrow viability. Eight weeks later the third dog was submitted to a bone scintigram with MDP-Tc 99 that probed the generation of new bone

Mandibular bone autograph is associated with bone viability and means the possibility of an easy reconstruction of large bone defects including mandibular segments. This would conduct to better treatment with wider resections and enhanced local control without preoccupations in relationship to esthetic and functional sequels.

2 INTRODUCCIÓN

El término cáncer es un término genérico que se refiere a más de 100 enfermedades genéticas distintas caracterizadas por la proliferación celular no ordenada, que se acompaña de la destrucción de tejidos adyacentes y de la capacidad de producir colonias distantes, o metástasis. El cáncer es un problema de salud pública en el ámbito mundial, ya que ocupa el segundo lugar en mortalidad en los países desarrollados, ubicándose detrás de las enfermedades cardiovasculares. Basados en las estimaciones globales, cada año se diagnostican alrededor de 20 millones de personas con cáncer en el mundo, ocasionando unas 12 millones de muertes, lo que representa el 10% del total de muertes. Usualmente es reconocido como un problema en los países desarrollados, sin embargo, más de la mitad de los casos en el mundo se observan en las tres cuartas partes de la población mundial que habita en los países en desarrollo.¹ También es importante resaltar la magnitud de los costos requeridos para el diagnóstico, tratamiento y rehabilitación de los pacientes con cáncer.

Un 30% de la totalidad de los casos de cáncer es causado por los efectos combinados del tabaco y el alcohol. En relación al cáncer de la cavidad bucal y de la bucofaringe ambos representan aproximadamente el 1% de las neoplasias malignas en México y un 90% de las ocasiones es debido a los factores arriba señalados. A pesar del fácil acceso a la cavidad bucal y la bucofaringe, que permitiría un diagnóstico temprano, dos terceras partes de los tumores se diagnostican con enfermedad avanzada local o regional. Esta situación se asocia a un pronóstico sombrío, ya que la supervivencia oscila entre 10 y 40% a 5 años, dependiendo de la etapa específica y la localización exacta del tumor.²

El tratamiento estándar de los tumores avanzados, consiste en la escisión quirúrgica tridimensional del tumor primario, la disección de los ganglios

regionales involucrados o en riesgo y la administración de tratamiento adyuvante, consistente en radioterapia o quimiorradioterapia, de acuerdo a indicaciones específicas.^{3 4} ,

Desde el punto de vista quirúrgico, la escisión tridimensional con frecuencia significa procedimientos quirúrgicos extensos asociados a importantes secuelas estéticas y funcionales. La afección mandibular requiere su resección y se indica la reconstrucción con el fin de minimizar las secuelas. La reconstrucción mandibular optimiza la acción de los músculos remanentes y mejora el contorno facial. Para la reconstrucción habitualmente se recurre a colgajos osteomiocutáneos micro-vascularizados de peroné o de la cresta iliaca.⁵

Aunque se han reportado aceptables resultados estéticos y funcionales, la reconstrucción con colgajos tiene desventajas, como la limitada disponibilidad de tejido donador, la extensa resorción ósea y la dificultad para obtener la forma y dimensiones apropiadas, sin dejar de mencionar la morbilidad asociada al sitio donador, que implica deformidad e incapacidad funcional transitoria.^{6 7} ,

Un enfoque a la reconstrucción mandibular, que podría minimizar las desventajas señaladas es la ingeniería de tejidos. La ingeniería de tejidos es un área en desarrollo que consiste en la aplicación de los principios de las ciencias biológicas e ingeniería para regenerar los tejidos o para crear substitutos biológicos útiles para restaurar, mantener o mejorar la función de cualquier tejido u órgano.⁸ Cualquier intento por generar tejidos, incluido el hueso, a través de ingeniería requiere conocer su estructura y función.

2.1 El tejido óseo: componentes celulares

Los huesos maduros, como la mandíbula, en un corte transversal, se aprecia están formados por una capa compacta externa (córtez, hueso cortical o hueso compacto) y una región central esponjosa (esponjosa o médula). El hueso compacto contiene estrechos canales vasculares, divididos en dos tipos en base a su orientación y su relación a la estructura laminar del hueso que lo rodea: canales longitudinales (Canales de Havers) y canales transversos u oblicuos (Canales de Volkmann). Excepto en la región articular, la corteza está rodeada por el periostio, el cual consiste de una capa fibrosa externa y una capa celular interna (cambium) con células osteoprogenitoras (fibroblastos y osteoblastos). Está última contiene también filamentos nerviosos que llevan impulsos propioceptivos y sensoriales. Haces de fibras colágenas penetran la capa compacta externa de la cortical, desde la capa externa del periostio y son

llamadas fibras de Sharpey. El entendimiento del aporte sanguíneo del hueso ayuda a entender la consolidación de las fracturas, la invasión por tumores óseos primarios o metastáticos, y la exitosa generación de hueso nuevo. La metáfisis está principalmente irrigada por arterias terminales que entran desde la diáfisis y terminan en el disco epifisiario. La epífisis recibe su aporte sanguíneo de una red de vasos anastomóticos. La cortical diafisiaria es irrigada por vasos que entran a través de los canales de Volkmann y que comunican con el sistema de Havers. Una arteria nutriente entra al canal medular cerca del centro de la diáfisis, se divide y se extiende distal y proximalmente. El intercambio metabólico de calcio y fósforo ocurre primariamente en la metáfisis.

Los osteoblastos son células productoras de hueso derivadas de células troncales mesenquimales que residen en la medula. Ultraestructuralmente recuerdan a los fibroblastos. Cuando se incorporan en la matriz ósea y residen en lagunas se les llama osteocitos, mientras que los osteoclastos son células gigantes multinucleadas involucradas en la reabsorción ósea. Por esta razón a menudo se les encuentra en cavidades poco profundas en la superficie de hueso, llamadas lagunas de Howship. Los osteoclastos surgen de precursores mononucleares del sistema monocito-macrófago. Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida que responde a hormonas osteotróficas y al efecto de la calcitonina. Ellos expresan antígenos específicos del osteoclasto (detectados por anticuerpos monoclonales 13c2 y 23c6, y no son reactivos para antígenos de células T, la mayoría de los antígenos mieloides y a los antígenos de macrófagos maduros). Además, varias metalo-proteínas de matriz han sido detectadas en los osteoclastos.

Por otra parte, el osteoide es una matriz precursora no mineralizada del hueso. Está compuesta de una mezcla de colágeno (principalmente tipo I), mucopolisacáridos ácidos y proteínas no-colágenas. Estas incluyen osteopontina, osteocalcina y proteína morfogenética ósea (BMP por sus siglas en inglés). El osteoide no es una masa homogénea, más bien muestra una secuencia de patrones de maduración y organización. Tiene propiedades acidofílicas en las tinciones con hematoxilina-eosina y puede ser difícil de distinguir de la colágena hialinizada.

El hueso en condiciones fisiológicas se forma a través de la mineralización del osteoide. Las vesículas de la matriz extracelular se presentan cerca o dentro del frente de mineralización y constituyen el sitio inicial de la deposición de la hidroxiapatita. El hueso lamelar está caracterizado por laminillas paralelas concéntricas, como se puede apreciar bajo visión con lentes polarizados.

2.2 El tejido óseo: componentes minerales

Para cumplir con las demandas de estabilidad y rigidez, la matriz osificada consiste principalmente de hidroxiapatita, un componente mineral duro compuesto por sales insolubles de calcio y fosfato ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que también contiene magnesio, sodio y bicarbonato.

La hidroxiapatita comprende cerca del 65% de la masa ósea. A su vez, la hidroxiapatita mineraliza una matriz orgánica, que como ya señalamos está básicamente compuesta por fibras de colágeno tipo I. Las fibrillas de colágeno están organizadas como una triple hélice de cadenas estabilizadas por puentes de hidrógeno y puentes covalentes entrecruzados. Las fibrillas se agregan en fibras, las cuales forman una red que soporta la integridad mecánica de la estructura ósea mineral y es responsable de la flexibilidad y resistencia a la tensión del tejido óseo. La red de colágeno es muy sensible a la hidratación (el agua constituye el 25% de la masa ósea). Especímenes de hueso deshidratado muestran dureza disminuida, pero un incremento en la rigidez.⁹

En conjunción con pequeñas cantidades de otros tipos de colágeno, otras proteínas y proteoglicanos, el componente orgánico comprende hasta un 10% de la masa ósea total.

2.3 Fisiología del hueso

La matriz ósea no es estática, constantemente es remodelada por sus componentes celulares en función de estímulos mecánicos, metabólicos, regenerativos y demandas hematopoyéticas. La carga mecánica es un estímulo mayor para la remodelación ósea. La remodelación es llevada a cabo por la unidad multicelular básica, compuesta por un grupo de osteoclastos reabsorbedores de hueso en el borde activo, seguidas por un grupo de osteoblastos formadores de matriz ósea.¹⁰ Los osteoblastos, ya señalamos, se originan de células progenitoras mesenquimales multi-potenciales.¹¹ Las células progenitoras son una sub-población de las células tallo mesenquimales, consistentes en fibroblastos capaces de diferenciarse en varios tipos celulares, incluyendo osteoblastos, condrocitos, mioblastos y adipocitos.¹²

2.4 Las células troncales

Las células troncales son un grupo muy especial de células que en condiciones normales se mantienen quiescentes pero son capaces de auto-renovarse y mediante división asimétrica producen una célula hija idéntica y una segunda célula progenitora que puede ser comprometida a un programa específico de diferenciación. Se presume que estas células permanecen en un estado indiferenciado mediante supresión por factores intrínsecos o extrínsecos, hasta que son estimuladas.

Hasta recientemente, se presumía que solo contribuían a la regeneración de los órganos donde residían y la restricción de su actividad explicaría porque algunos órganos no se regeneran tan bien como otros. Pero el concepto ha sido

desafiado con el descubrimiento de células multi-potentes aisladas de varios tejidos, aún el nervioso, que habían sido considerados incapaces de regeneración. Estas células llamadas troncales recuerdan las poblaciones celulares pluri-potentes derivadas del embrión temprano, y podrían contribuir a regenerar virtualmente cualquier tipo de tejido bajo condiciones experimentales apropiadas.

Las células troncales embrionarias derivan de embriones tempranos sin notoria diferenciación y se presume que las células troncales adultas, encontradas en los tejidos maduros han retenido una población de células troncales embrionarias de reserva, que podrían estar comisionadas a la regeneración en la vida posterior.

2.4.1 Células troncales embrionarias

Un cultivo de células embrionarias derivadas de la masa celular interna, o embrioblasto, de un blastocisto, satisface las características señaladas para las células troncales.

Pueden ser probadas en ratones usando marcadores de células troncales embrionarias para formar embriones quiméricos y documentando su contribución en la forma de células identificables en diferentes tejidos de las ratas jóvenes.¹³ ,

En el laboratorio, uno de los aspectos técnicos complejos es la identificación de las condiciones de cultivo apropiadas, que mantienen las células en un estado indiferenciado o inducen su diferenciación. Además de factores solubles, las superficies pueden afectar la morfología celular, mientras que la densidad celular puede influenciar las interacciones entre las células y la transfección de genes inductores de diferenciación pueden guiar a las células embrionarias pluripotentes a un destino celular específico.

Este proceso es más un arte que una ciencia. Las células de ratón cultivadas de la masa celular interna han sido inducidas a generar múltiples tipos de células, incluyendo vasculares,¹⁵ neuronales,¹⁶ pancreáticas,¹⁷ y aún oocitos haploides.¹⁸

Estudios paralelos se han enfocado en las células germinales humanas embrionarias, aisladas del surco gonadal de embriones de 8 a 10 semanas.¹⁹ Estas células son muy proliferantes y cuando son diferenciadas en cultivo, expresan múltiples marcadores específicos de diferenciación.

2.4.2 Las aplicaciones de las células troncales embrionarias

Existe una intensa investigación dirigida a generar tejidos humanos para trasplante, como células endocrinas pancreáticas, miocitos esqueléticos y neuronas. Como prueba del potencial terapéutico, neuronas productoras de dopamina derivaron de células embrionarias troncales y establecieron conexiones electro-fisiológicas apropiadas cuando fueron inyectadas en cerebros de ratas con enfermedad de Parkinson. Notablemente la función motora mejoró.²⁰

22 23 24

Aunque las células troncales embrionarias humanas son pluripotentes²¹, , , no es posible probarlas como las provenientes de modelos animales, ya que la reimplantación en embriones humanos no se considera ético ya que podrían incluir células troncales de cáncer que podrían proliferar.²⁵

2.4.3 Las células troncales en los tejidos adultos

Debido a las limitaciones para usar células troncales embrionarias, se ha intensificado la investigación y búsqueda de células troncales adultas basados en información proveniente de estudios de células troncales en la medula ósea, las cuales se renuevan continuamente para mantener el suministro sanguíneo. En la medula ósea del ratón, las células troncales son tan raras de como 1 en 10,000 células y podrían ser menos comunes en los tejidos humanos, sin embargo, proliferan constantemente para reemplazar la sangre circulante.²⁶ Dan origen a precursores intermedios o poblaciones progenitoras que parcialmente se diferencian y se comprometen en varios linajes sanguíneos.²⁷ Las células troncales denominadas hematopoyéticas tienen características morfológicas adicionales y marcadores de superficie que permiten rastrearlas en la sangre y

tejidos blanco o ser aisladas y cultivadas in vitro.²⁸ , ,

La observación de la plasticidad de las células troncales del adulto surgió de la observación de que células donadoras eran encontradas en tejidos no hematopoyéticos de los receptores de trasplantes de médula ósea.

Esto sugiere, que estas células pueden contribuir a virtualmente cualquier tipo celular. Como prueba, una célula troncal hematopoyética genéticamente marcada y mezclada con medula ósea no marcada fue inyectada en un ratón que recibió una dosis letal de radiación, varias semanas después, los descendientes marcados fueron encontrados en múltiples tejidos.³¹ Pero estos reportes deben ser tomados con precaución ya que existen reportes contradictorios.³²

Además de las células troncales hematopoyéticas en la médula ósea existe al menos otra variedad de células troncales. Las células estromales de la medula ósea del adulto son fuente de células troncales que pueden ser inducidas a la diferenciación hacia una variedad de tejidos adultos³³ y estas células pueden ser idénticas a las denominadas células troncales mesenquimales.³⁴ La fácil proliferación de las células troncales mesenquimales cultivadas las hace buenas candidatas para terapia.³⁵ Como ejemplo, las células troncales mesenquimales purificadas de la médula ósea del adulto se injertaron en el corazón de ratones inmunodeficientes y persistieron en el miocardio, tomando las características de los cardiomiocitos.³⁶

Las células troncales mesenquimales es probable sean una población heterogénea, de la cual solo una proporción mantiene una verdadera pluripotencia.

2.4.4 La lesión, angiogénesis y las células troncales adultas

Aun está por definirse si es necesaria una lesión para inducir la diferenciación de las células circulantes. Aunque la baja frecuencia de células adultas troncales que repoblan los tejidos dañados impedirían la regeneración de órganos completos, solo un pequeño número de células troncales sería necesario para inducir los programas regeneradores.

Ratones o ratas a los que se les ha inducido infartos tienen recuperaciones sorprendentes cuando células troncales de la médula ósea son administradas, ya sea directamente en el corazón,³⁷ ó a través de la circulación.³⁸

Aunque las células troncales que se alojaron en el miocardio dañado fueron pocas para reemplazar los tejidos necróticos, estas se concentraron en el área infartada, sugiriendo que la repoblación por células troncales podría ser desencadenada por la lesión. La evidencia sugiere que las células troncales, como los tumores metastásicos usan mecanismos quimiotácticos comunes para alojarse en los tejidos dañados.³⁹

Además, uno de los estudios reportó la inducción de neo-vascularización en los tejidos circundantes,⁴⁰ lo cual habría contribuido a mejorar la recuperación. Si las células troncales se pueden alojar en los sitios del daño y promover la cicatrización, podría no requerirse de muchas células como se pensaba.

La notable plasticidad y pluri-potencia de las células de la médula ósea sugieren la posibilidad de que una célula troncal universal pudiera alojarse en el cuerpo, tomando residencia cuando fuera necesario para promover la regeneración. Evidencia reciente sugiere que la plasticidad de las células troncales residentes de los tejidos adultos podría ser similar al observado en las células en la médula ósea.⁴¹

La pluri-potencia de las células troncales adultas no hematopoyéticas ha sido demostrada por estudios en los cuales células extraídas de varios tejidos adultos fueron trasplantadas en animales irradiados y tomaron residencia en la médula ósea, reconstituyendo el sistema hematopoyético completo. Aún tejidos que habían sido considerados terminalmente diferenciados, con poco potencial para la regeneración, contiene suficientes células.⁴²

Células troncales obtenidas del sistema nervioso central han sido inducidas para reconstituir la médula ósea⁴³ o el músculo esquelético⁴⁴ en animales adultos. Estos resultados apoyan el concepto de plasticidad de las células neurales, lo cual había sido sugerida por estudios que demostraron neurogénesis incrementada en el cerebro adulto después de una lesión. Aunque existen reportes contradictorios⁴⁵ diferentes protocolos podrían ser los responsables de los resultados variables.⁴⁶

Células troncales aisladas del músculo esquelético también son capaces de repoblar la medula ósea después de dosis letales de irradiación.⁴⁷ Es igualmente probable la regeneración de tejidos a partir de células troncales hematopoyéticas circulantes, como lo sugiere un reporte que documenta el origen hematopoyético de las células troncales asociadas al músculo.

Se requieren estudios para determinar si las poblaciones heterogéneas de células troncales que emanan de la médula ósea y se alojan en tejidos periféricos constituyen el verdadero origen de la mayoría de las células troncales periféricas.⁴⁸

Quizá el problema más serio para la aplicación clínica de las células troncales adultas es el pequeño número de células que pueden aislarse de tejidos adultos. La propagación de células troncales multi-potentes y el desarrollo de cócteles de citocinas para optimizar la proliferación⁴⁹ sugiere que la expansión en cultivo es la respuesta, aunque es posible que el cultivo ex-vivo pudiera cambiar las

propiedades intrínsecas, haciéndolas inapropiadas para restaurar los tejidos dañados.

El uso de células troncales para la generación de hueso es un punto clave en la aplicación de la ingeniería de tejidos, considerando la facilidad del uso y accesibilidad de las células osteo-progenitoras.

En relación a la no menor importante angiogénesis, los factores que conducen al desarrollo normal de la vasculatura embrionaria son recapitulados durante situaciones de neoangiogénesis en el adulto. Hay un número de factores involucrados en la neo-angiogénesis, los principales protagonistas son: el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el Factor básico de Crecimiento de los Fibroblastos (bFGF), varios miembros de las familias del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF β) e hipoxia: Factor de Transcripción Inducible por Hipoxia (HIF). Otros factores que tienen propiedades angiogénicas son las angiopoyetinas, (Ang-1); Factor de Crecimiento del Hepatocito (HGF); Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF-BB); familia del Factor de Crecimiento Semejante a la Insulina (IGF-1, IGF-2) y las Neurotrofinas (NGF).

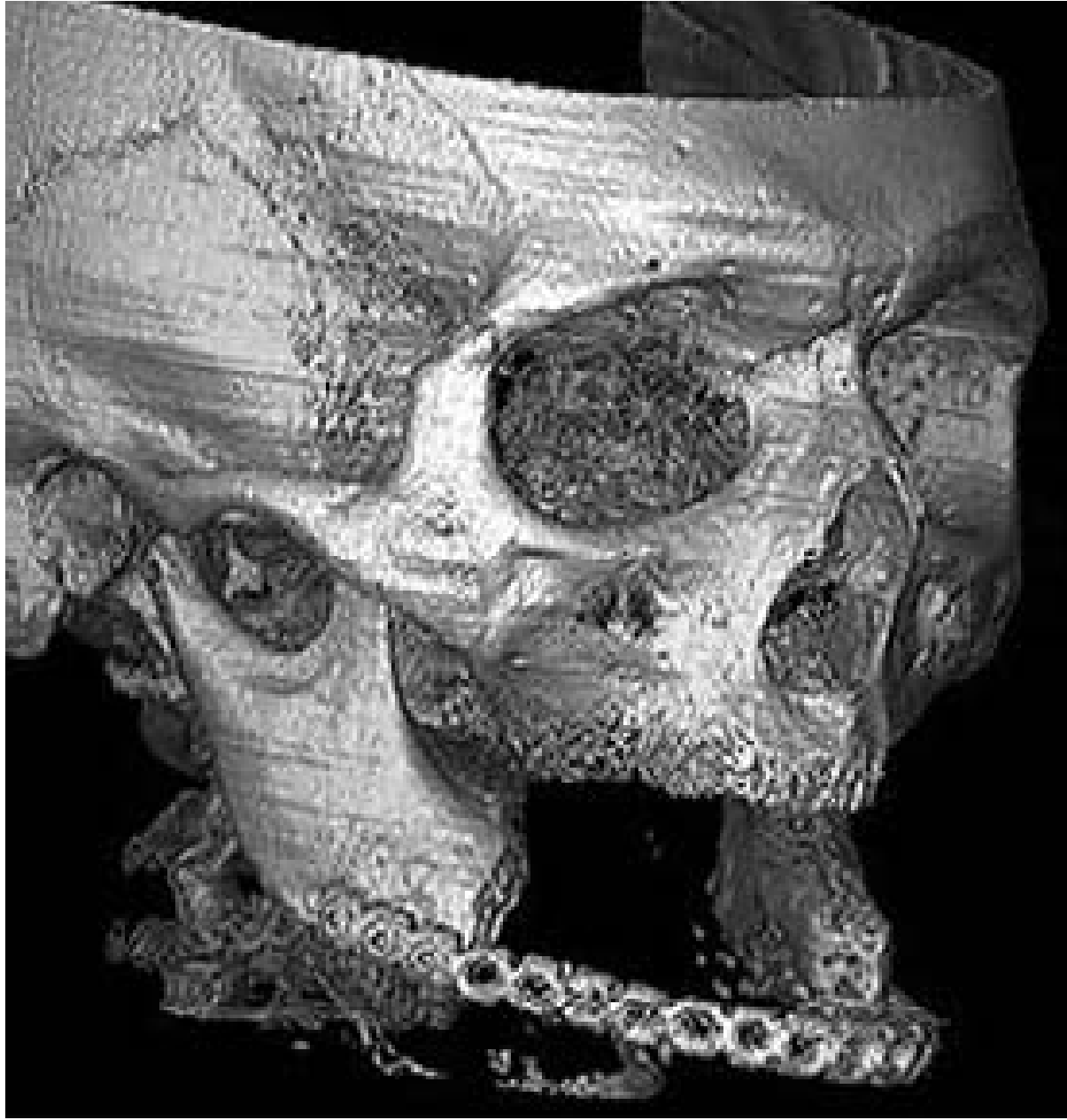
Los VEGFs y sus receptores correspondientes son reguladores clave en la cascada de eventos moleculares y celulares que finalmente conducen al desarrollo del sistema vascular, ya sea por vasculogénesis, angiogénesis o en la formación del sistema linfático. Aunque VEGF es un regulador crítico en la angiogénesis fisiológica también juega un papel significativo en el crecimiento esquelético y reparación y por supuesto en cualquier intento para generar tejidos por ingeniería.

En la vasculatura madura establecida, el endotelio juega un papel pivote en el mantenimiento de la homeostasis del tejido circundante proporcionando una red comunicativa a los tejidos vecinos para responder a los requerimientos necesarios. Aun más, la vasculatura provee los factores necesarios como factores de crecimiento, hormonas, citocinas, quimocinas y metabolitos necesarios y actúa, cuando es necesario, como barrera que limita el movimiento de moléculas y células. Las señales y factores de atracción expresadas en el endotelio óseo ayudan a reclutar las células circulantes, particularmente células hematopoyéticas a la médula ósea y coordina con las células metastásicas para dirigirse a las regiones esqueléticas. Por ello, cualquier alteración en el aporte vascular al tejido óseo, puede conducir a patologías como osteonecrosis, osteomielitis y osteoporosis. Un número de factores se ha encontrado tienen un efecto prominente en la patología de la vasculatura y el esqueleto, incluyendo

Osteoprotegerina (OPG), la cual inhibe al Receptor Activador del ligando de NF κ B (RANKL) inducido por la resorción ósea osteoclastogénica. Ratones transgénicos que sobreexpresan OPG muestran un marcado incremento en la densidad ósea (osteopetrosis) con pocos osteoclastos activos. Adicionalmente, los ratones deficientes en OPG exhiben un fenotipo osteoporótico caracterizado por decremento de la densidad ósea, trabeculación severa y porosis cortical, con alta incidencia de fracturas. Sin embargo, ratones deficientes de OPG-también exhiben calcificación de la media de la aorta y arterias renales, indicando el papel de OPG en la asociación entre osteoporosis y calcificación vascular.⁵⁰

Aprovechando estos conocimientos, Gronthos recientemente publicó un caso exitoso de reconstrucción mandibular diferida después de varios años de la resección mandibular debida a un problema oncológico. El uso como molde una malla de titanio que había modelado previamente mediante reconstrucciones tridimensionales por computadora a partir de tomografía computada. El molde generado se rellenó de hueso esponjoso del propio paciente, más colágena, hueso particulado y proteína morfogenética ósea (BMP) con el fin de propiciar la generación de hueso nuevo. El molde fue mantenido debajo del músculo dorsal ancho durante 8 semanas, al termino de éste tiempo fue escindido con músculo adyacente y colocado en el lecho mandibular y anastomosado en forma microvascular aprovechando los vasos del dorsal ancho a los vasos del cuello.^{51 52} El hueso se mantuvo viable a juzgar por un gamagrama óseo practicado varias semanas después. **(Figuras 17)**

Figura 1.-Tomografía y su reconstrucción tridimensional que muestra un defecto mandibular



parcialmente reconstruido con una placa de titanio, debido al tratamiento oncológico de un tumor de la encía.

Figura 2.-Reconstrucción virtual de la mandíbula a partir de la tomografía para generar un molde base.

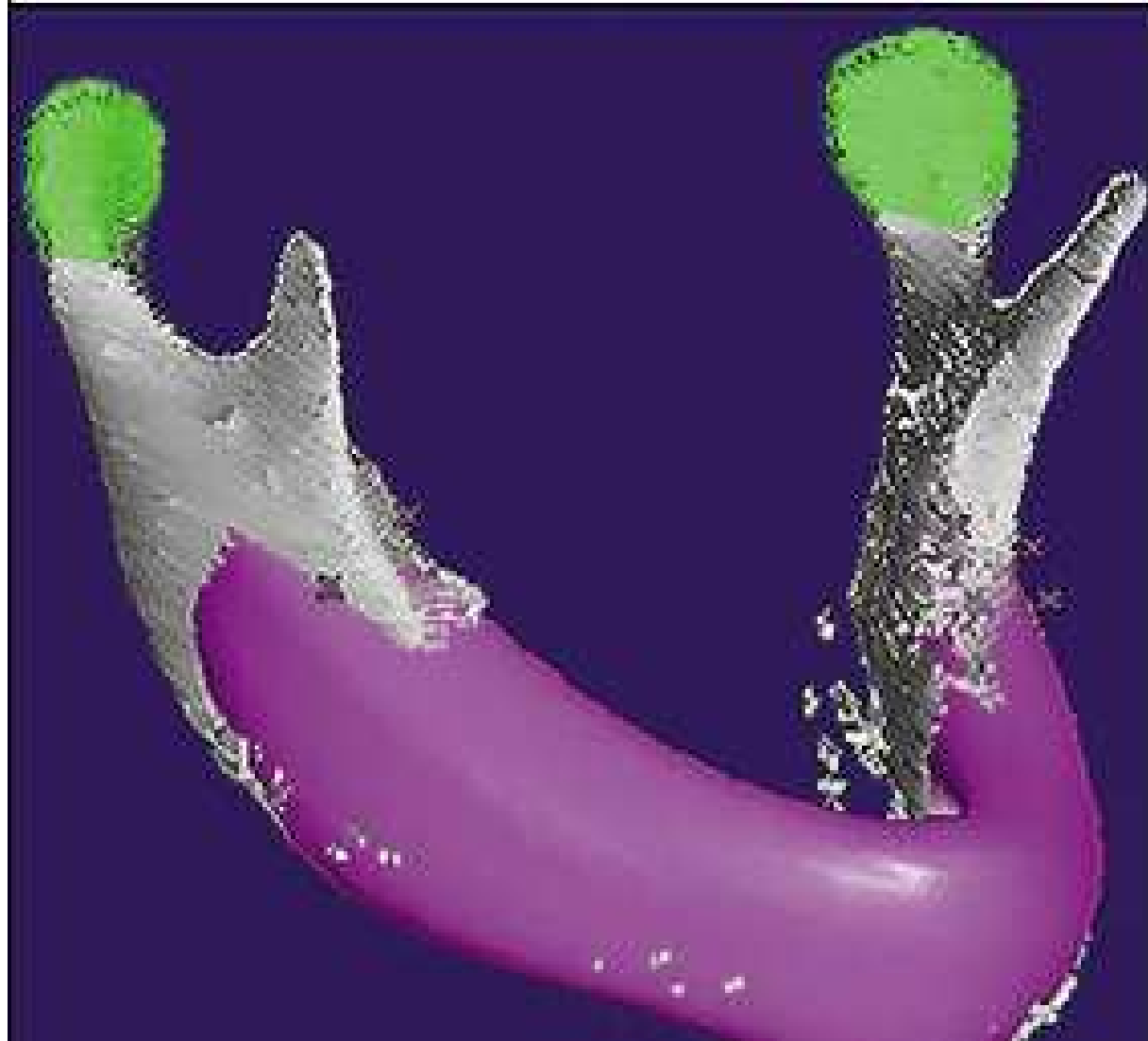


Figura 3.-A partir de la reconstrucción virtual se generó un molde con una malla de titanio y se rellenó con hueso esponjoso, colágena y BMP.



Figura 4.- Molde del hueso implantado al músculo dorsal ancho.

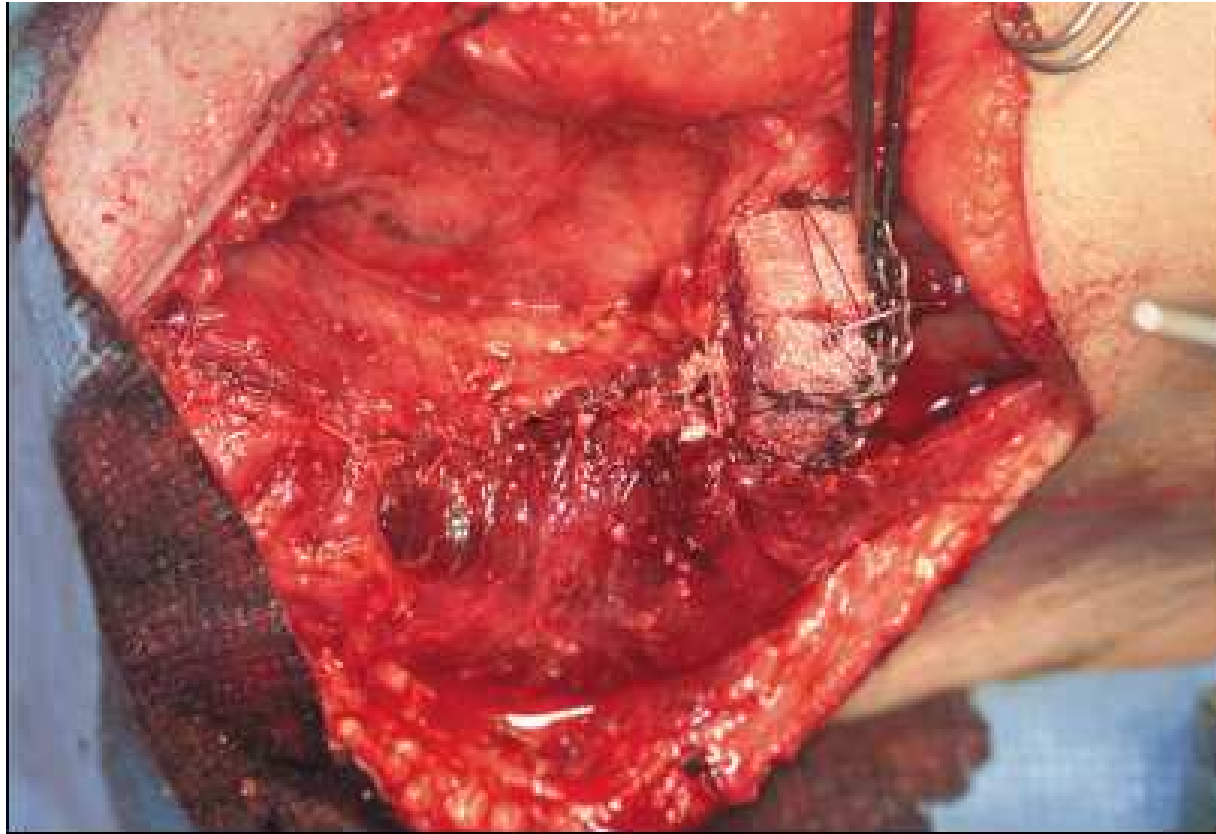
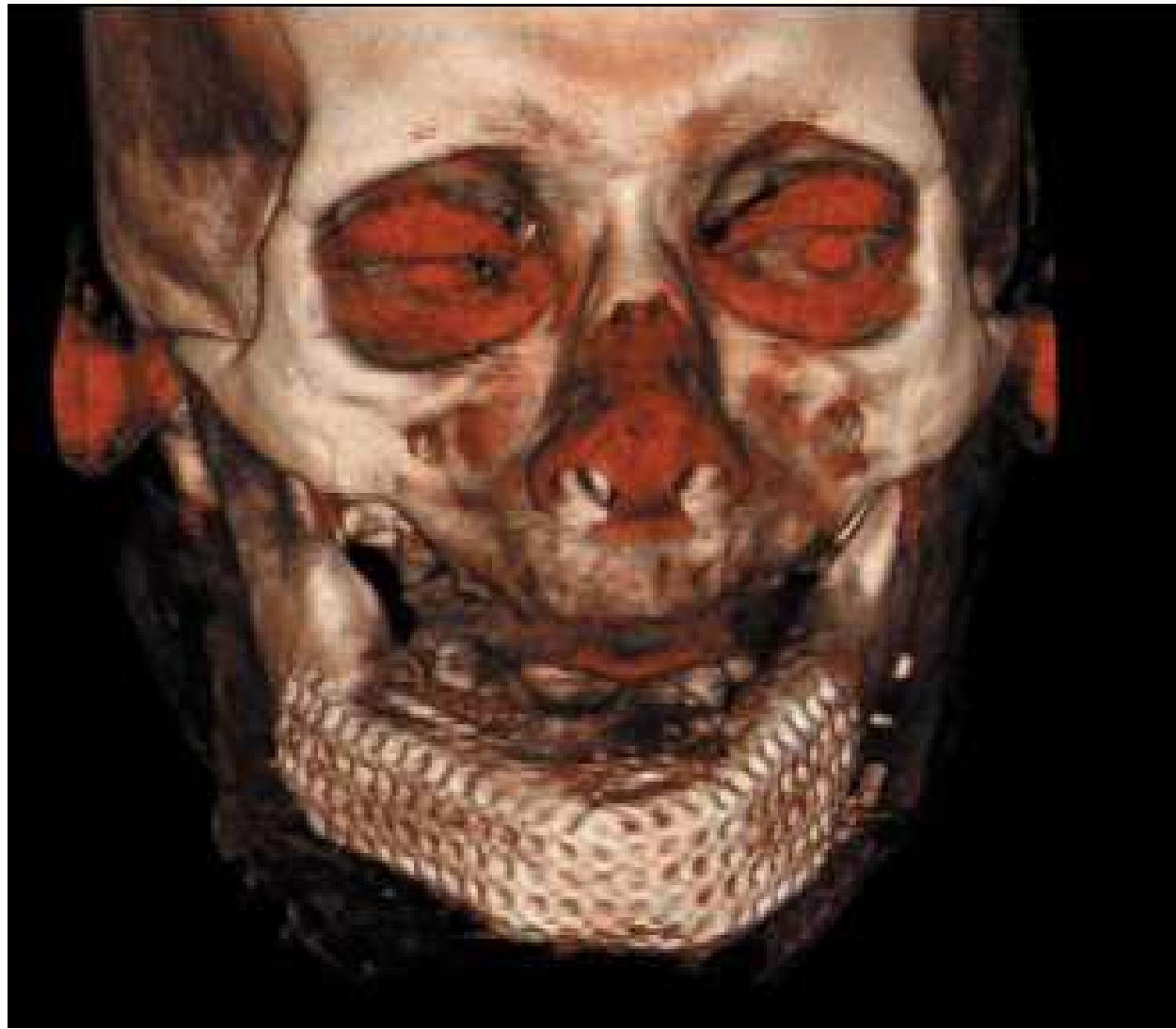


Figura 5.- Molde implantado en relación al músculo dorsal ancho

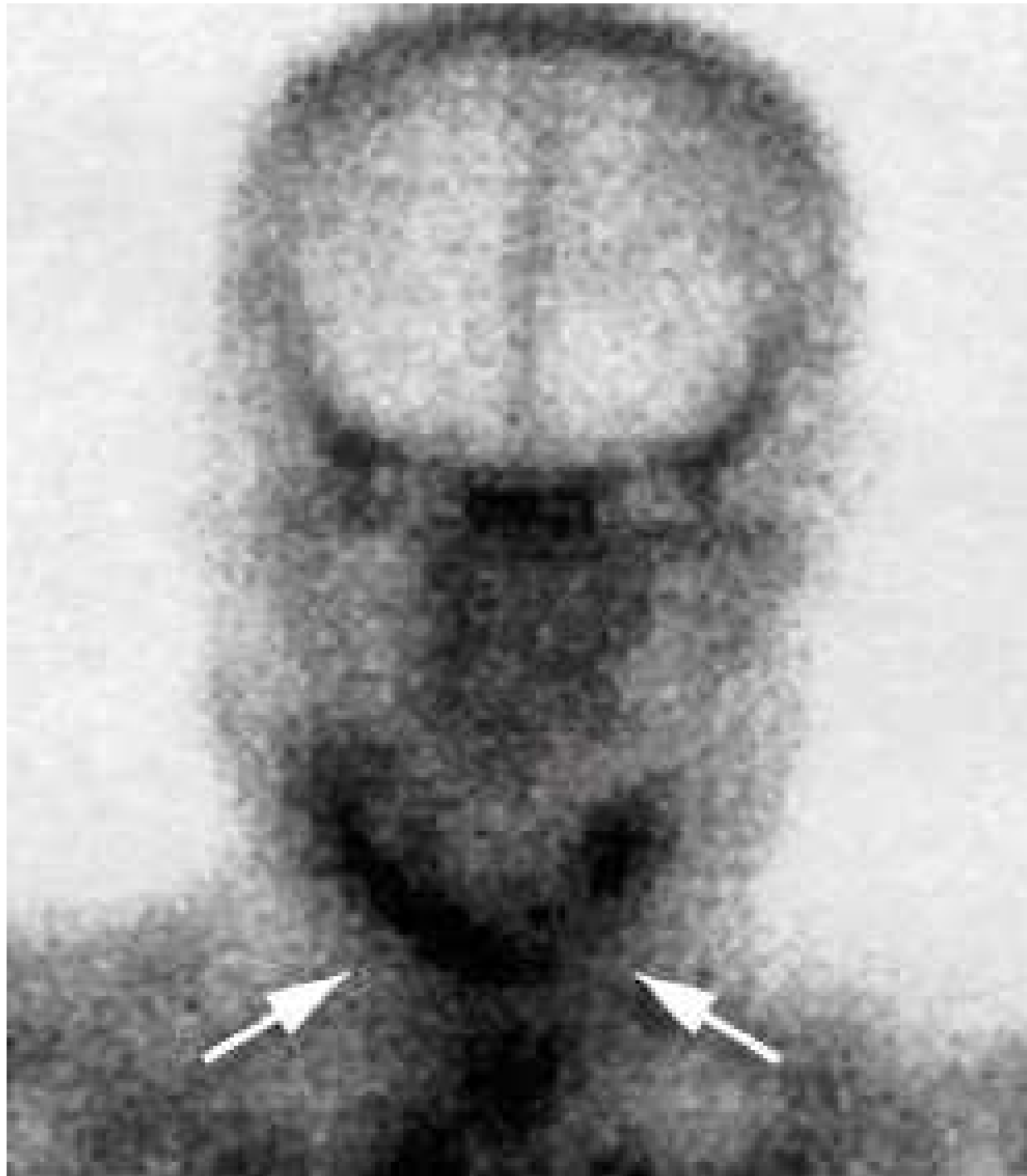


Figura 6.-Implante instalado en su sitio y anastomosado a los vasos faciales aprovechando los



vasos procedentes del músculo dorsal ancho.

Figura 7.-Gamagrama óseo que demuestra la formación de hueso nuevo.



2.5 Anatomía de la mandíbula

Un problema particular de reconstrucción ósea lo constituye la reconstrucción mandibular. La mandíbula contribuye a la conformación de la cavidad bucal con los rebordes alveolares y el triángulo retromolar, sin embargo sus funciones son más relevantes que la simple conformación de la cavidad, como veremos más adelante.

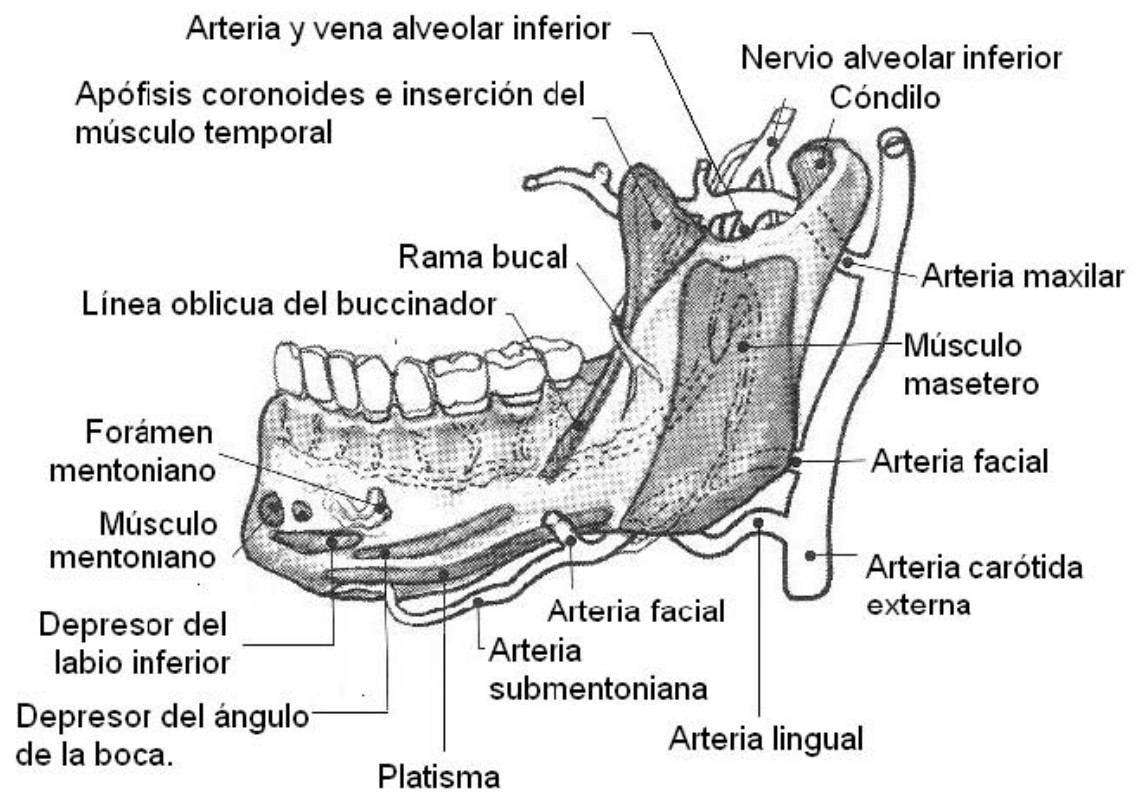
La mandíbula es dividida en varias regiones, incluyendo el cóndilo, el cuello, el proceso coronoideo, la rama ascendente, el ángulo, el cuerpo y la sínfisis. En su porción anterior, una protuberancia a lo largo del borde inferior de la sínfisis forma la prominencia mentoniana. El foramen mentoniano, el cual da paso al nervio mentoniano, está localizado a la derecha e izquierda en la línea media de la mandíbula, en el punto donde se ubica la segunda pieza bicúspide. La mandíbula en los edéntulos y la subsecuente reabsorción del hueso alveolar ponen al nervio mentoniano en una relativa posición superior. La línea oblicua o milohioidea es palpable corriendo inferior al foramen desde el ramus.

La espina mentoniana está en la superficie lingual de la mandíbula, en la sínfisis y provee inserción a los músculos genioglosos, mientras que el genihioideo surge de un borde justo debajo de ésta espina, mientras al tiempo que el milohioideo se inserta a lo largo de la superficie interior de la sínfisis en la línea oblicua o milohioidea ya mencionada.

La rama ascendente se erige en un plano hacia la vertical (110-120 grados) y provee unión al masetero a lo largo de su superficie lateral y al pterigoideo medial en la superficie interna. También en la superficie interna, el foramen mandibular permite el pasaje del nervio alveolar inferior (V3) y varios vasos sanguíneos hacia el canal mandibular, para viajar hacia foramen mentoniano. Varias ramas desde el canal medular se extienden a cada canal alveolar para proveer de sensibilidad a las piezas dentarias.

El cuello del cóndilo es superior a la rama ascendente y provee la inserción del músculo pterigoideo lateral. El cóndilo se articula con el hueso temporal en la articulación temporo-mandibular. Anterior al cuello está una escotadura a través de la cual el masetero recibe su aporte neurovascular y anterior a esta escotadura está el proceso coronoideo en el cual el músculo temporal se inserta lateral y medialmente. **(Figuras 810).**

Figura 8.-Detalles de la anatomía ósea y neuro-muscular de la mandíbula



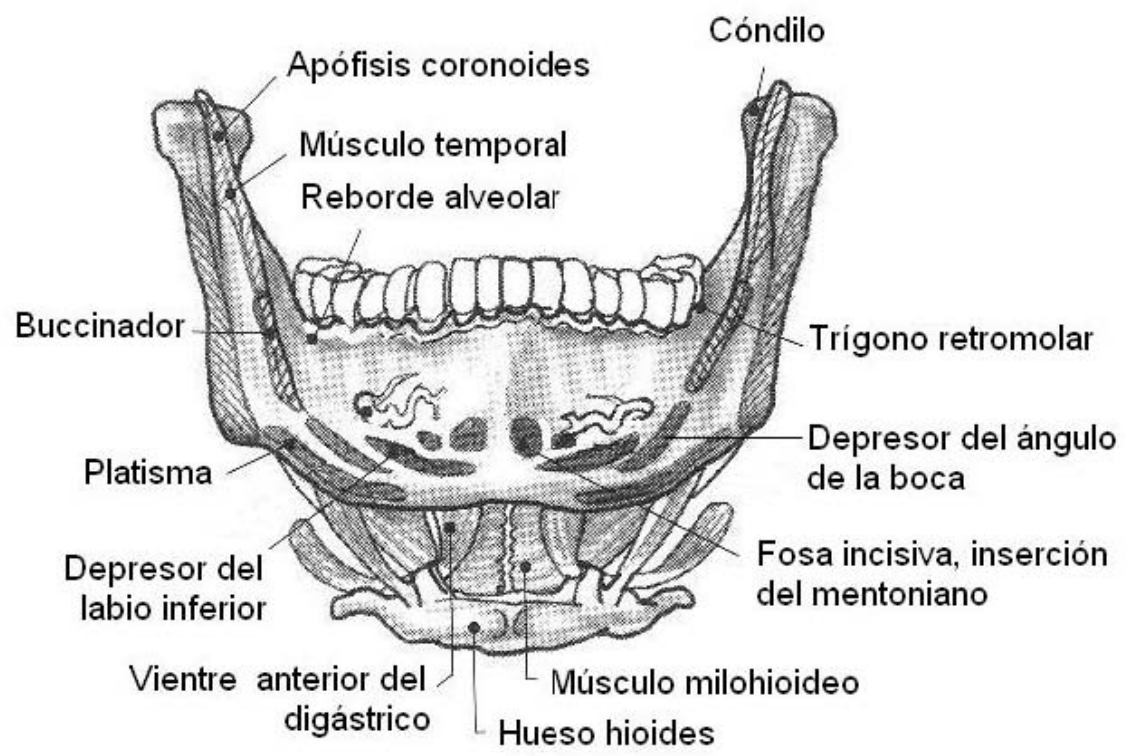
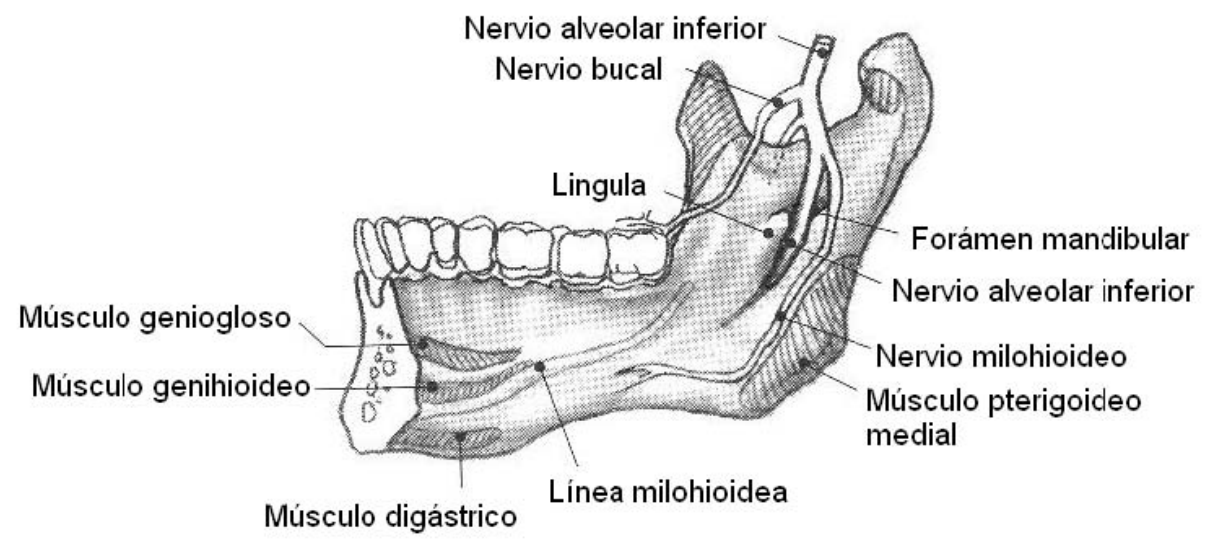


Figura 9.-Detalles de la anatomía ósea y neuro-muscular de la mandíbula

Figura 10.-Detalles de la anatomía ósea y neuro-muscular de la mandíbula



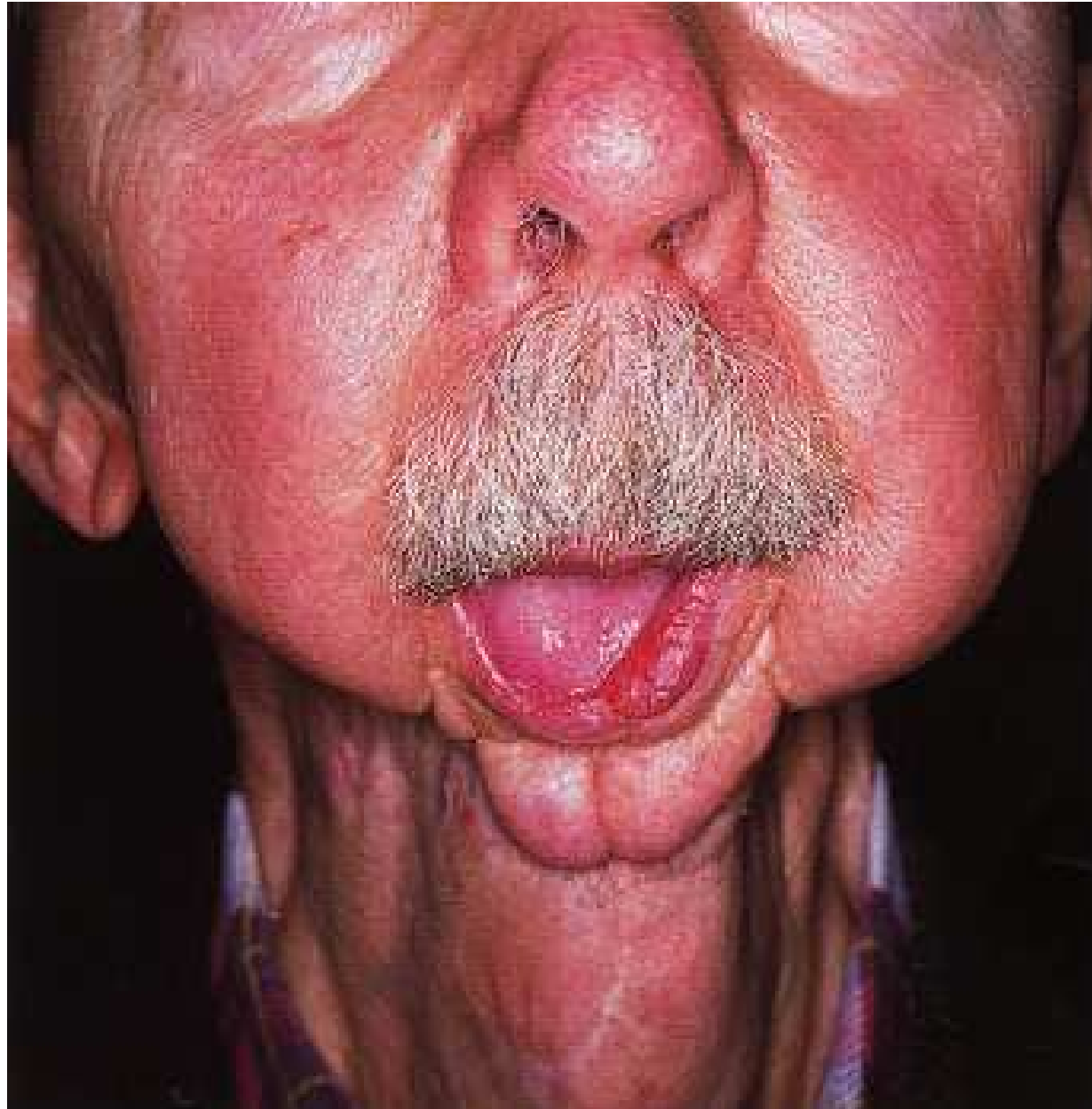
La mandíbula representa un caso conspicuo, ya que participa en forma muy importante proporcionando la necesaria inserción a la musculatura que participa en la masticación, deglución y articulación de la palabra. Su ausencia deteriora grandemente las mencionadas funciones así como el contorno facial. El deterioro funcional hace necesario al paciente alimentarse a través de sondas y respirar a través de traqueotomía ya que la deglución deteriorada propicia aspiración hacia las vías aéreas, con atelectasia y neumonía secundarias. La resección de la porción sinfisaria de la mandíbula y la falta de soporte de la musculatura que ahí se inserta hace que esta se colapse cuando el paciente está en posición supina, obstruyendo las vías aéreas, por lo que la traqueostomía resulta indispensable.

2.6 Manejo de la mandíbula en afecciones oncológicas

Como ya mencionamos, la mandíbula es la porción ósea móvil de la cavidad bucal que contribuye a la masticación, deglución y articulación de la palabra a través del soporte que ofrece a los músculos del piso de la boca y musculatura extrínseca de la lengua.

Como otros órganos y huesos de la economía, la mandíbula es asiento de una variedad de tumores: primarios, secundarios y metastásicos. Los tumores óseos primarios malignos más frecuentes son los sarcomas óseos (osteosarcoma y condrosarcoma). Con relación a los tumores secundarios estos se originan en las membranas mucosas de la cavidad bucal y se diseminan por contigüidad afectando la estructura ósea; son más frecuentes que los primarios y el tipo histológico más común es el carcinoma de células escamosas. Por ultimo, los tumores metastásicos se originan en órganos distantes y por vía hematógena alcanzan a la mandíbula, los más frecuentes se originan en la mama, los pulmones, riñón y glándula tiroides.

Estos tumores, para su tratamiento, a menudo requieren de la resección mandibular y su resección, en consecuencia, deteriora importantes aspectos estéticos y funcionales. (Figura 11)



-

Figura 11.-Aspecto de un paciente sometido a mandibulectomía total sin reconstrucción. El defecto deteriora la deglución, fonación e impide la respiración en decúbito supino.

La resección es necesaria para obtener el control local, condición necesaria, aunque insuficiente para aspirar a la curación, y permitir un resultado funcional compatible con una buena calidad de vida.

En relación al patrón de invasión y en el caso de los carcinomas de células escamosas originados en las mucosas, es bien conocida la presencia de al menos dos patrones de invasión. El patrón infiltrativo, también llamado invasivo, se caracteriza por proyecciones tumorales y la presencia de islas neoplásicas que avanzan casi sin restricción en el hueso esponjoso, con poca actividad osteoclástica y sin intervenir una capa de tejido conectivo. En contraste, en el patrón erosivo el tumor avanza en un frente amplio de tejido conectivo y activa los osteoclastos separando el tumor del hueso. La invasión suele ser limitada debido a la resistencia relativa a la invasión que presenta el tejido conectivo y el hueso cortical no radiado.⁵³

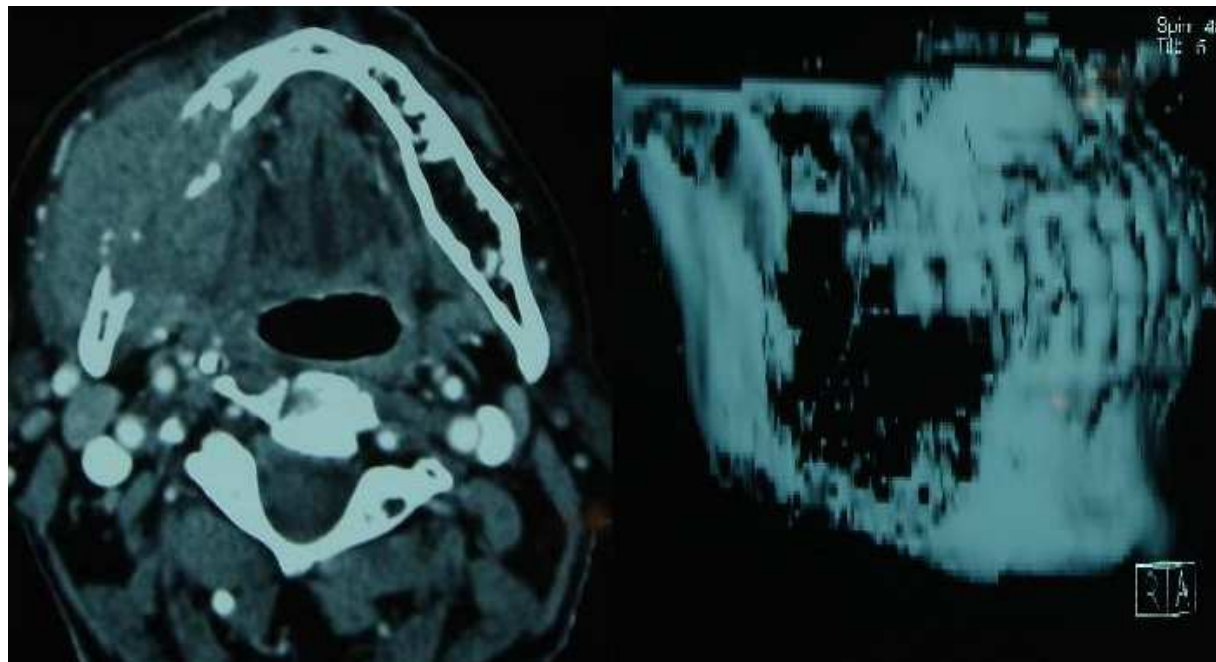
2.7 Tipos de resección mandibular

La mandíbula obviamente invadida por clínica o estudios de imagen, (**Figura 12**) se trata mediante una resección segmentaria, que implica seccionar un segmento de la mandíbula perdiendo su continuidad. La resección segmentaria también se indica si existe alto riesgo de invasión no reconocida clínicamente. Los indicadores son la presencia de un tumor que envuelve la mandíbula, el antecedente de extracción dental o la pérdida espontánea de piezas dentarias en el sitio del tumor, otras indicaciones son la presencia de un tumor que está en contacto con la mandíbula radiada previamente o cuando la mandíbula tiene resorción ósea avanzada, de suerte que no es posible realizar una resección marginal y mantener la fortaleza mandibular.⁵⁴ (**Figura 13**)

Análisis retrospectivos sugieren que el margen óseo macroscópico, cuando el tumor erosiona la cortical mandibular y la mandíbula no ha sido radiada (patrón erosivo) debe ser de un centímetro. Un margen de esta dimensión produce el control local, a nivel óseo, del 98%. En contraste, si el tumor ha logrado penetrar el canal medular, por ejemplo, a través de los defectos alveolares secundarios a extracciones dentarias previas (patrón infiltrativo), podría requerirse una escisión mayor, controlada mediante improntas del canal medular.

Cuando el tumor está cercano a la mandíbula (<1 cm) o sólo invade al periostio, la decisión es más compleja, pero comúnmente se requiere una resección marginal, que elimina un fragmento de mandíbula con relación al tumor, sin alterar su continuidad. En forma más precisa, se ha propuesto el despegamiento del periostio en forma transoperatoria con el fin de evaluar una eventual invasión ósea. Si el hueso es liso y brillante podría dejarse intacto. Si es opaco y con poros finos indica invasión perióstica y se requiere de una resección marginal, pero si el periostio se queda adherido al hueso, indica invasión ósea y se requiere una resección segmentaria.⁵⁵

Figura 12. -Mandíbula obviamente invadida por un tumor de la encía
Figura 13. Tipos de resección mandibular



- A. Resección marginal variedad oblicua, para los tumores cercanos a la mandíbula, ubicados en el proceso alveolar o el piso de la boca que no invaden el hueso.

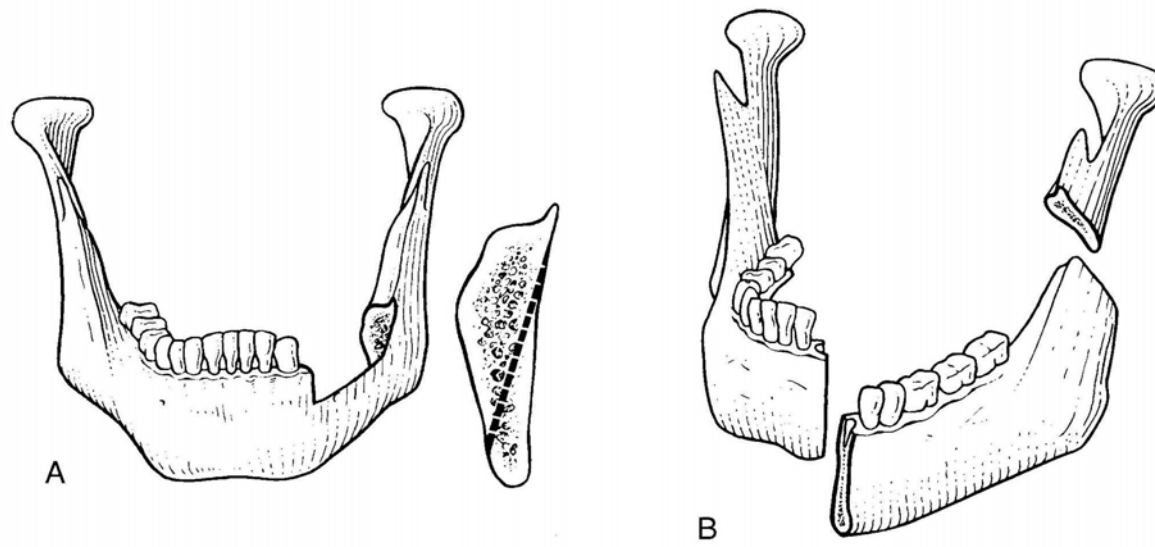


Figura 13. Tipos de resección mandibular

- B. Resección segmentaria, para los tumores con invasión probada de la mandíbula.

En general, la resección segmentaria de la mandíbula requiere de una reconstrucción inmediata, mientras que mantener el borde inferior de la mandíbula (mandibulectomía marginal) simplifica la reconstrucción, minimizando la morbilidad.

El mejor estudio o combinación de estudios para evaluar preoperatoriamente la mandíbula no ha sido determinado debido a la gran heterogeneidad de los estudios. Sin embargo, la tomografía parece ser el mejor estudio inicial en el caso de sospecha de patrón invasivo e IRM en caso de patrón infiltrativo con extensión al canal medular.

En términos generales, la resección de un tumor con mandíbula intacta a menudo se hace con abordajes transorales, pero cuando existe involucro macroscópico del hueso mandibular a menudo se requiere un abordaje combinado transoral y transcervical.

2.8 Reconstrucción mandibular: Injertos libres

El problema de la reconstrucción mandibular, es un problema viejo. Inicialmente se intentó reconstruir con injertos autólogos o alo-injertos con resultados muy variables^{56, 57, 58}, ya que se observó que en los defectos mayores de 4 cm pocas veces se mantenían viables, por lo que pronto se buscaron alternativas.

Se han usado también materiales protésicos, entre ellos las placas de reconstrucción elaboradas de titanio y cubiertas con tejidos blandos del paciente, pero con resultados no satisfactorios debido a que la disponibilidad limitada de tejidos blandos hace que con frecuencia erosionen los tejidos adyacentes y se espongan las placas, además no permiten la instalación de prótesis dentales.

2.9 Reconstrucción mandibular: colgajos libres

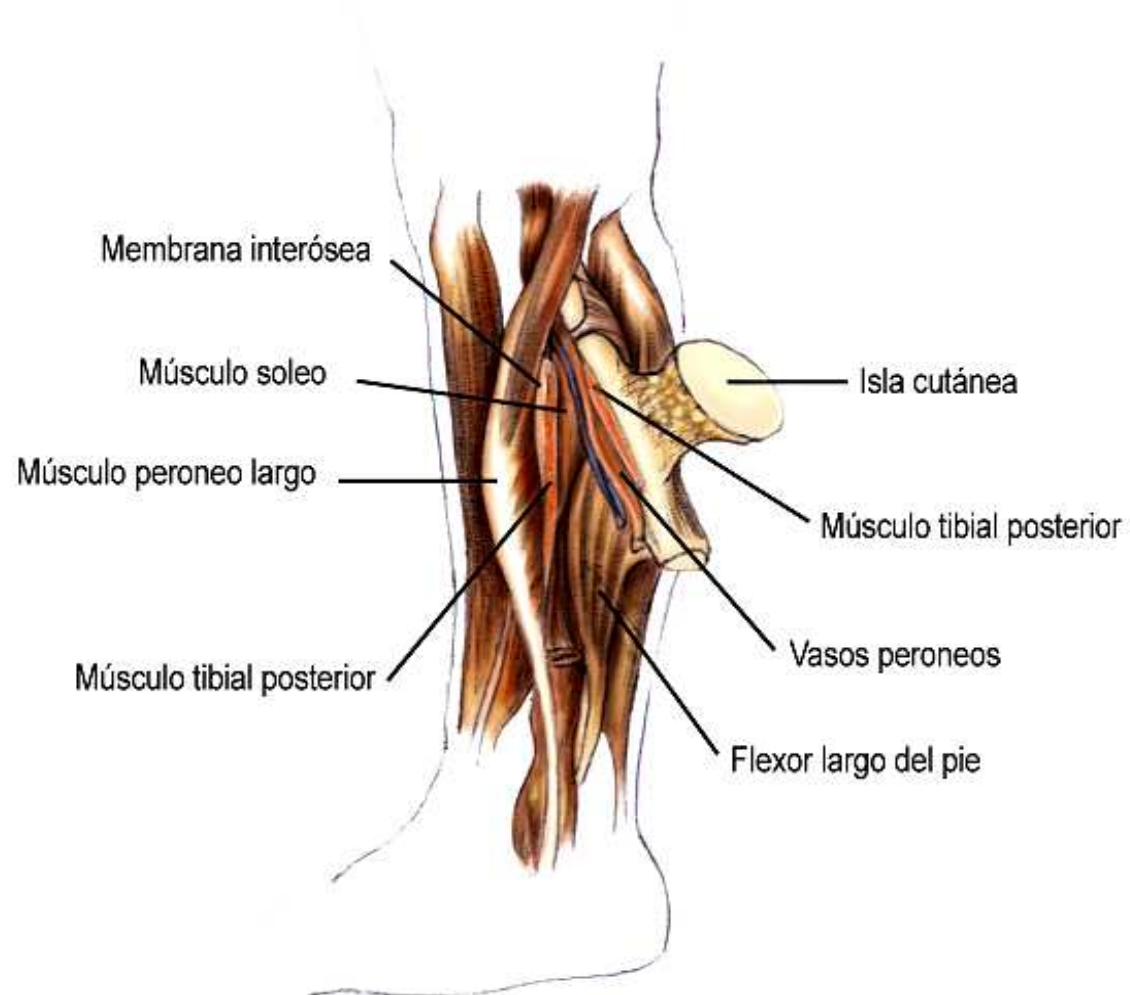
La resección mandibular, especialmente en su porción sinfisaria se asocia a morbilidad significativa debido a que la desinserción de los músculos del piso de la boca y lengua que dejan a esta última sin soporte, lo que deteriora o impide la deglución, incluso de las propias secreciones y deteriora en forma importante la articulación de la palabra y la deglución. Afortunadamente la reconstrucción de defectos compuestos de cabeza y cuello ha evolucionado con el desarrollo de técnicas microquirúrgicas que hacen posible la reconstrucción de áreas funcionales, como la mandíbula, mediante el uso de colgajos distantes microanastomosados.

Los colgajos compuestos vascularizados permiten reconstruir defectos mandibulares mayores de 4 cm (ya que defectos menores podrían ser reconstruidos con injertos no vascularizados) y facilitan la rehabilitación oral posterior mediante la utilización de implantes osteointegrados. Actualmente esta forma de reconstrucción representa el estándar de manejo.

2.9.1 Colgajo osteocutáneo de peroné microvascularizado}

Esta opción es una de las más utilizadas por su versatilidad, ya que su vascularización perióstica y endóstica segmentaria (a través de la arteria peronea, que proviene del tronco tibio-peroneo) permite llevar a cabo osteotomías para dar el contorno requerido. Su vascularidad, de la arteria peronea deriva en pequeñas perforantes que permiten elevar una isla de piel delgada, ideal para defectos de cubierta interna.^{59 60} (Figura 14)

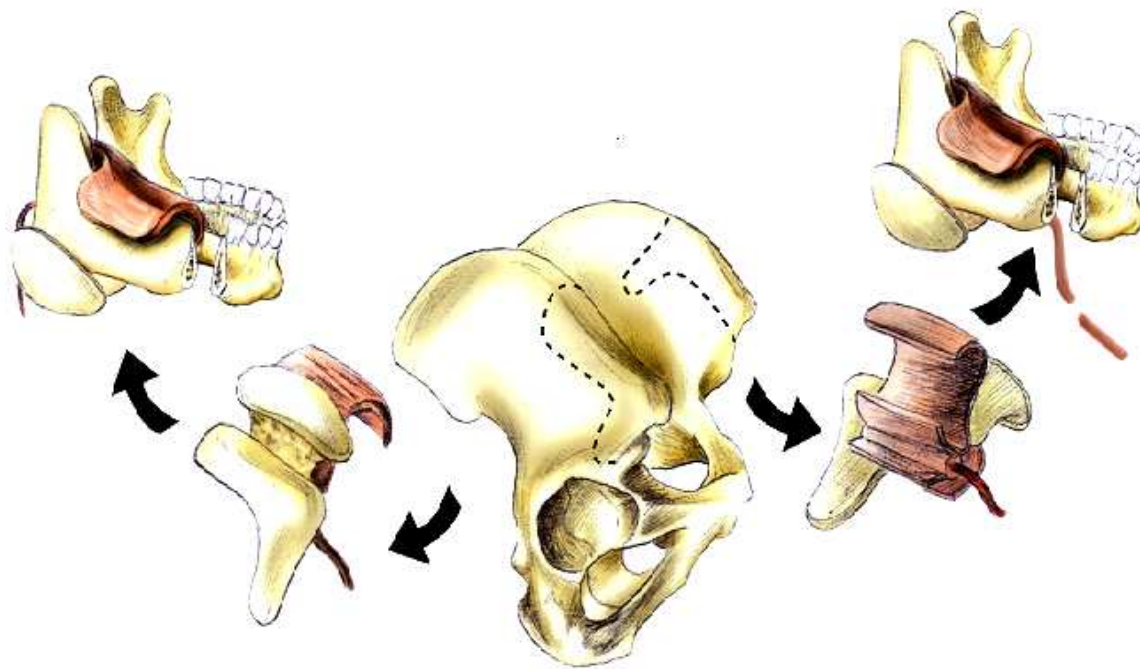
Figura 14.-Anatomía del colgajo osteo-septo cutáneo de peroné



2.9.2 Colgajo osteocutáneo de cresta iliaca microvascularizada

Este colgajo basado en la arteria circunfleja profunda representa una opción en la reconstrucción mandibular debida a defectos óseos y de tejidos blandos, ya que el contorno óseo de la cresta iliaca permite obtener una unidad hemimandibular con una cubierta cutánea y muscular adecuadamente vascularizada. Este colgajo es ideal para reconstrucciones mandibulares funcionales complejas, ya que la altura y dimensiones óseas facilitan la utilización de implantes osteo-integrados. La zona donadora presenta pocas secuelas si es reparada adecuadamente, respetando los diferentes planos. Este colgajo es especialmente apropiado en pacientes del género femenino.⁶¹ **(Figura 15)**

Figura 15.-Anatomía del colgajo de cresta iliaca



2.9.3 La necesidad de procedimientos alternativos

Aunque los colgajos representan el estado del arte en lo que a reconstrucción mandibular se refiere, tiene desventajas, como la limitada disponibilidad de tejido donador, la extensa resorción ósea y la dificultad para obtener la forma y dimensiones apropiadas. Además de la morbilidad asociada al sitio donador, que implica deformidad, e incapacidad funcional transitoria. Otros problemas derivan de la necesidad de una infraestructura sofisticada y la necesidad de personal con interés y experiencia en este tipo de procedimientos, que no es fácil de conseguir.

Por ello resulta atractivo generar procedimientos mas reproducibles y sencillos que generen la forma exacta del hueso a reparar. Entre estas opciones existe la posibilidad de estimular la viabilidad y generación de hueso a través del uso de factores estimulantes, presentes en el plasma rico en plaquetas (PRP) o la

62 63 64 65 66 67 68

proteína morfogenética humana (BMP) , , , , , . sobre sustratos

adecuados, como las células troncales mesenquimales. A estos componentes se les ha denominado osteoinductores.

Como parte de esta estrategia también se ha recurrido a utilizar el hueso esponjoso obtenido del propio paciente, con más frecuencia de la cresta iliaca, o preparados comerciales de hueso, generalmente bovino, o el uso de materiales sintéticos plásticos o cerámicos porosos con el fin de servir de molde para la regeneración de hueso^{69 70} , . A estos componentes se les ha denominado osteoconductores. Actualmente esta metodología se usa con cierto éxito en pequeños defectos faciales o maxilares y en la preparación del proceso alveolar para recibir implantes osteointegrados cuando ha habido considerable

72 73

reabsorción ósea.⁷¹ , ,

Se considera que para una reconstrucción exitosa se requiere de la incorporación adecuada de materiales osteoinductores y osteoconductores.

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La reconstrucción mandibular con colgajos osteomiocutáneos es costosa y se acompaña de malos resultados estéticos y funcionales. La forma no es adecuada, las dimensiones son muy diferentes. Esta forma de reconstrucción está limitada por la disponibilidad de tejidos y las secuelas en los sitios donadores. (Figura 16)

Figura 16.-Reconstrucción mandibular con colgajo osteomiocutáneo de peroné. Obsérvese las



dimensiones muy inferiores del colgajo respecto a la mandíbula normal. Lo que limita la fortaleza mandibular y su rehabilitación dentaria.

La utilización de una técnica alternativa para la generación de tejido óseo, y en particular para la reconstrucción de la mandíbula, evitando en lo posible el uso de colgajos microvascularizados es un área de gran relevancia clínica. Esto permitiría mejorar los resultados de los procedimientos reconstructivos actuales, ampliando sus aplicaciones a otros escenarios del tratamiento oncológico.

En nuestra institución, cada año se tratan 60 pacientes con cáncer de la cavidad bucal de los cuales el 65% tienen tumores localmente avanzados y de ellos un 50% tienen algún involucro mandibular. Estos defectos con frecuencia no son reconstruidos debido a las pobres condiciones del paciente, pero también porque la reconstrucción tradicional agrega varias horas de cirugía, costos, y morbilidad que no siempre son bien tolerados. Un procedimiento menos mórbido abriría el espectro de pacientes reconstruidos asociándose a mejor calidad de vida.

4 OBJETIVOS

Primario: Demostrar que un segmento óseo esterilizado y reconstituido con médula ósea (autoinjerto esterilizado y reconstituido con médula ósea autóloga) se mantiene viable lo que permitiría desarrollar un procedimiento alternativo de reconstrucción ósea.

Secundarios: Evaluar la morfología microscópica del hueso reconstruido y su correlación con los estudios de medicina nuclear, con renio coloidal para evaluar la viabilidad de la médula ósea y con MDP-Tc 99 para demostrar la formación de hueso nuevo.

5 HIPÓTESIS

Un fragmento óseo, esterilizado en autoclave (autoinjerto esterilizado) pierde los tejidos blandos viables, incluyendo los neoplásicos, pero deja un molde mineralizado que al ser reconstituido con médula ósea autóloga será repoblado gracias a la presencia de células troncales mesenquimales y la formación de vasos nuevos, manteniéndose viable y posibilitando su uso en la reconstrucción mandibular.

Si el hueso reconstituido se mantiene viable será corroborado mediante la demostración, por medios histopatológicos, de médula ósea y vasos de neoformación 8 semanas después de su reconstitución. Esto se correlacionará con el gammagrama de renio coloidal que tiene capacidad de evaluar indirectamente la viabilidad de la médula ósea y con MDP-Tc 99 que demuestra la formación de hueso nuevo.

6 DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Manejo preoperatorio

Este protocolo fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Cancerología y por el Comité de Investigación en Animales de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

Por razones éticas, antes de practicar el procedimiento propuesto creímos pertinente realizar un estudio de factibilidad en un modelo animal. Creemos que dicha experimentación se justifica ya que es relevante para la salud humana y eventualmente la animal.

La especie propuesta se eligió debido a que las dimensiones facilitan su cuidado y a que las dimensiones del segmento mandibular resecaado son semejantes a las humanas, lo que creemos es importante ya que la viabilidad debida a los vasos de neoformación esta limitado por las dimensiones. Una especie pequeña representaría un problema distinto al observado en humanos. El manejo quirúrgico y los cuidados postoperatorios se hicieron de acuerdo a las especificaciones de la NOM062-ZOO-1999 que indica el buen uso, manejo y cuidado de los animales de laboratorio.

Se dio, en lo posible, el mejor trato a los animales, buscando el bienestar y para ello, entre otras cosas, se procedió a administrar anestesia en el acto quirúrgico y analgesia postoperatoria. Además se limitó el número de animales sometidos a cirugía a los estrictamente necesarios para la demostración o no de la viabilidad ósea.

6.2 Procedimiento quirúrgico

Tres perros mestizos machos con edad estimada de 1 a 4 años de edad, y cuyo peso oscilaba entre 15 y 20 kg fueron sometidos a cuarentena y desparasitación y se mantuvieron alojados en el bioterio de la Escuela Superior de Medicina en condiciones de higiene hasta el momento del procedimiento quirúrgico.

Los tres perros fueron sometidos al procedimiento planeado el mismo día.

En condiciones de ayuno durante la noche, los perros se sometieron a profilaxis antibiótica con cefalexina a dosis 25 mg/kg vía intravenosa administrada en el momento de la inducción anestésica.

Luego de canalizar una vena de la pata trasera con solución Hartman y mantener una infusión continua de la solución se procedió a la anestesia. La inducción se realizó con propofol a dosis de 4 mg/kg de peso, administrados en bolo y se mantuvo la anestesia con el mismo fármaco en pequeños bolos a dosis-efecto.

La cavidad oral se preparó con isodine y posteriormente se procedió a escindir un segmento de mandíbula mediante un abordaje intra-oral, luego de incidir la mucosa gingival fija inmediatamente debajo de su inserción en la unión entre la corona y la raíz. La extensión de la resección se extendió desde el agujero mentoniano hasta el ángulo de la mandíbula, resultando en una pieza quirúrgica con una dimensión que osciló entre 6 y 7 cm.

Una vez que se le retiró mediante disección cortante la mayor masa posible de tejidos blandos se procedió a la esterilización del fragmento, para ello el segmento resecado se colocó en una vasija de cristal pyrex y se le sometió a esterilización en una autoclave con vapor de agua a presión de 103 kPa ó 15 lbf/in² y temperatura de 121° C durante 40 minutos, mientras tanto el perro se mantuvo anestesiado.

Luego de la extracción de la pieza del autoclave se extrajeron las piezas dentarias y al segmento óseo se le hicieron perforaciones en la cortical hasta alcanzar el canal medular con una pieza de mano y brocas quirúrgicas de 3 mm de diámetro, cada 10 mm, evitando perforar el borde inferior de la mandíbula para mantener la mayor fortaleza. Además se fresó el borde oclusal de la mandíbula para obtener una superficie regular.

A través de los orificios se introdujo hueso convertido en partículas producto del fresado de la cortical y de las perforaciones, estas partículas fueron mezcladas con médula ósea roja obtenido de la cresta iliaca antero-superior mediante punción con aguja especial para tal fin. La mezcla se hizo a volúmenes iguales. No se hizo uso anticoagulantes. La cantidad de la mezcla se buscó fuera la necesaria para empacar los orificios en la cortical y el canal medular.

La mucosa de la cavidad bucal fue cerrada mediante puntos separados con vycril 000. El fragmento óseo reconstituido se introdujo, mediante una incisión de 2 cm, en el lomo del perro, debajo del músculo dorsal ancho cuidando la perfecta hemostasia. La herida quirúrgica fue cerrada por planos con vycril® calibre 000.

6.3 Manejo postoperatorio

La profilaxis antibiótica en el postoperatorio continuó con cefalexina a dosis de 25 mg/kg vía bucal; se administró cada 24 hrs hasta completar 72 horas iniciando 12 horas después de la conclusión de la cirugía.

La analgesia se realizó con rofecoxib a dosis de 2.0 mg / kg PV. BID por 3 días. El perro se mantuvo en ayuno por 12 hrs y posteriormente la dieta se adecuó para evitar que el animal se lastimara (dieta blanda).

7 RESULTADOS

Tres perros se sometieron a la cirugía en la forma planeada. El tiempo quirúrgico promedio fue de 90 minutos (70-110). El sangrado promedio fue de 100 ml (60140). La evolución postoperatoria no tuvo eventualidades, las heridas en la cavidad bucal y lomo cicatrizaron sin mayores problemas. La **figura 17** muestra un segmento de mandíbula perforado y siendo reconstituido con la mezcla a partes iguales de médula ósea roja y hueso particulado sin anticoagulantes. La **figura 18** muestra la ubicación del hueso reconstituido debajo del músculo dorsal ancho

Figura 17.-Hueso mandibular reconstituido con medula ósea roja y hueso particulado.

Figura 18. -Reconstrucción tridimensional tomográfica de un animal de experimentación que



muestra el injerto reconstituido ubicado en el lomo (por debajo del músculo dorsal ancho).

Cuatro semanas después de la cirugía inicial los perros se sometieron a gamagrama de médula ósea roja con 15 mCi de renio coloidal, este fue inyectado a través de la vena



canalizada, se distribuyó a la economía y fue captado selectivamente por la médula ósea. El radiofármaco emite partículas radioactivas que son captadas con por un detector apropiado que es traducido en imagen. Esta mostró viabilidad del hueso en los 3 animales al momento de la evaluación.

(Figura 19)

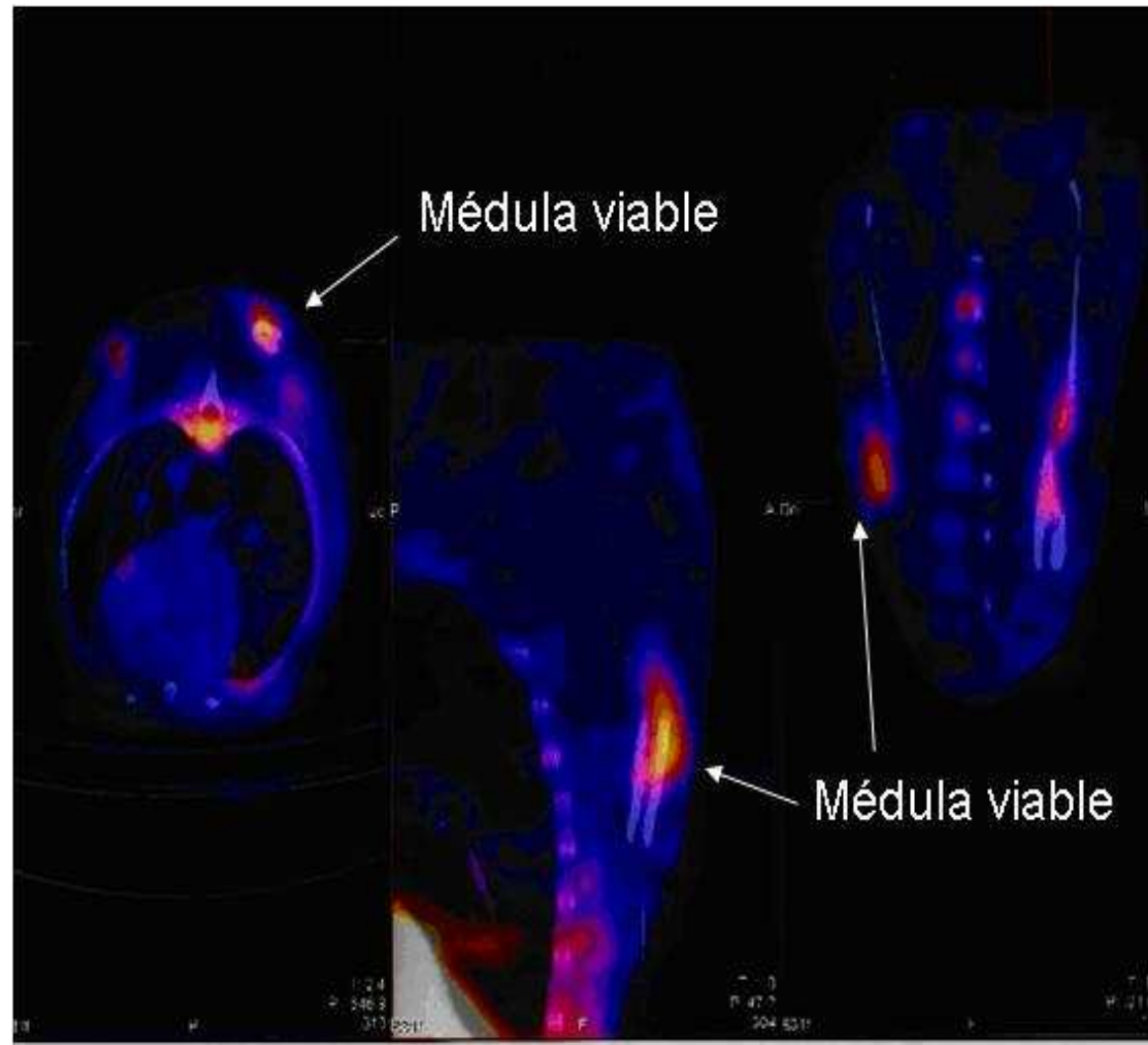
La imagen gammagráfica se fusionó con una imagen tomográfica para mejor evaluación e identificación anatómica de las zonas captantes. Dos perros

fallecieron después de realizar el gamagrama con renio coloidal, debido a insolación, pero los dos fragmentos de mandíbula fueron procesados para estudio histopatológico y en ambos se demostró la presencia de médula ósea viable, en ambos la presencia fue obvia, con formación de vasos nuevos, osteoide y células compatibles morfológicamente con osteoclastos. **(Figura 20)** Los cambios predominaban en las perforaciones practicadas al autoinjerto. En un hueso además se demostró infiltrado inflamatorio agudo y formación de microabscesos compatibles con osteomielitis.

En la semana 12 el perro restante fue sometido a gamagrama óseo con 20 mCi de MDP-99TC con los que se probó la generación de hueso nuevo **(Figura 21)**. Esto fue corroborado en la imagen histológica de los segmentos analizados mediante la demostración de la formación de osteoide **(Figura 22)**. Al término del estudio el perro fue sacrificado mediante una sobredosis intravenosa de propofol.

Figura 19. -Gamagrama con 15 mCi de renio coloidal con fusión de imágenes de tomografía que muestra captación del radiofármaco, lo que indica viabilidad de la médula ósea. Las imágenes eran en esencia idénticas en los perros A, B y C.

Figura 20A.-Perros A y B. Obsérvese el escaso tejido medular en el perro B en algunos de los



orificios practicados, atribuible a infección agregada.

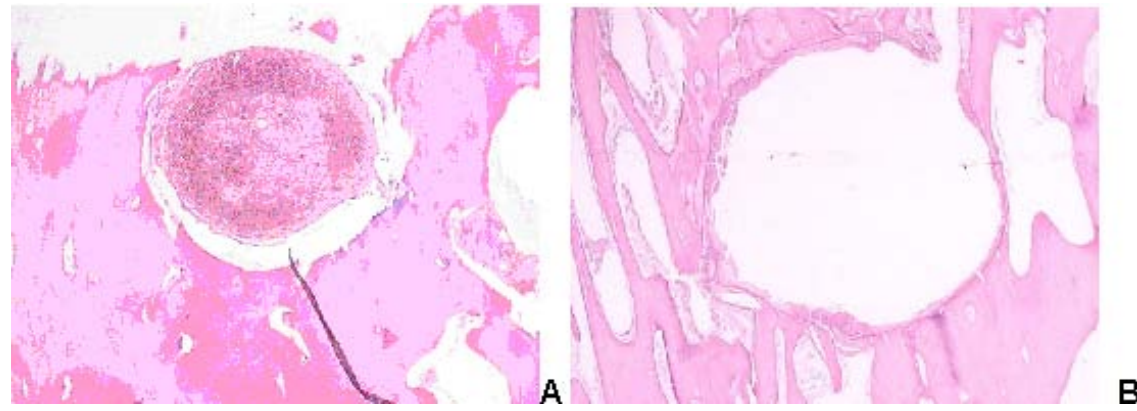
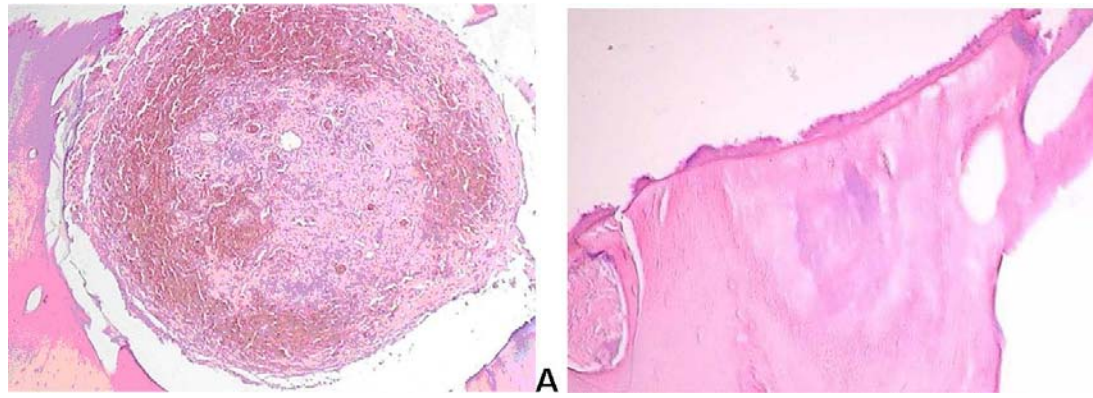
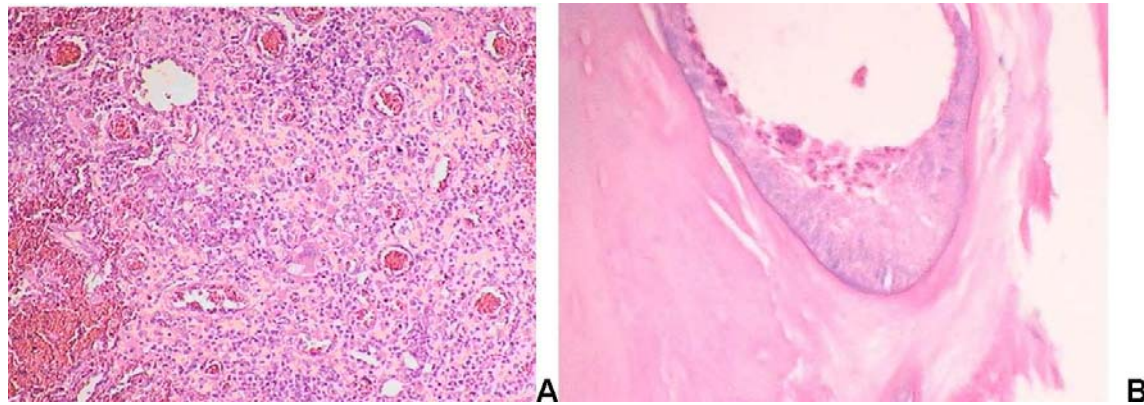


Figura 120B.-Perros A y B. Imagen a mayor aumento y detalle en el perro B, donde se observa la



presencia de bacterias en el borde del tejido medular adherido a la pared de algunos orificios. En los restantes orificios la imagen fue indistinguible de las imágenes mostradas en el perro A.

Figura 20C.-Perros A y B. Mayor aumento que muestra la celularidad y formación de vasos en



perro A y detalle en perro B que muestra presencia de médula ósea asociada a infiltrado inflamatorio agudo en algunos orificios.

Figura 21. – Diferentes proyecciones del gammagrama óseo con 20 mCi de MDP-99Tc practicada al perro C que muestra captación del radiofármaco lo que demuestra la formación de hueso nuevo. Las flechas indican el autoinjerto instalado debajo del músculo dorsal ancho y la captación del radiofármaco.

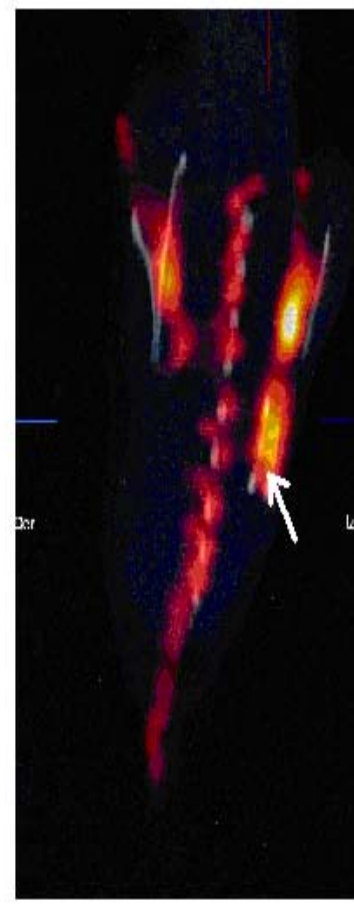
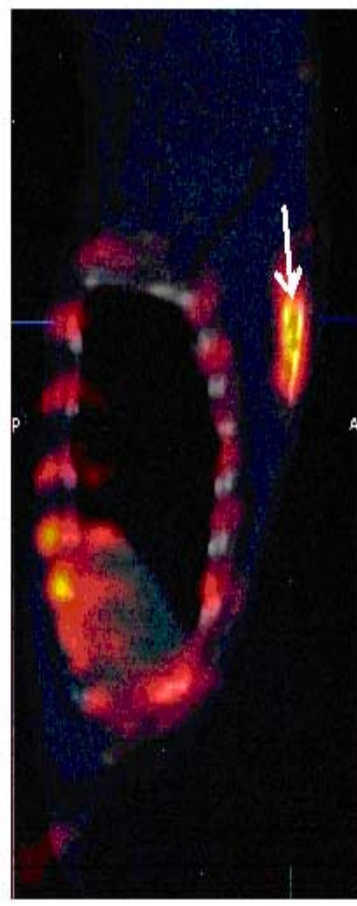
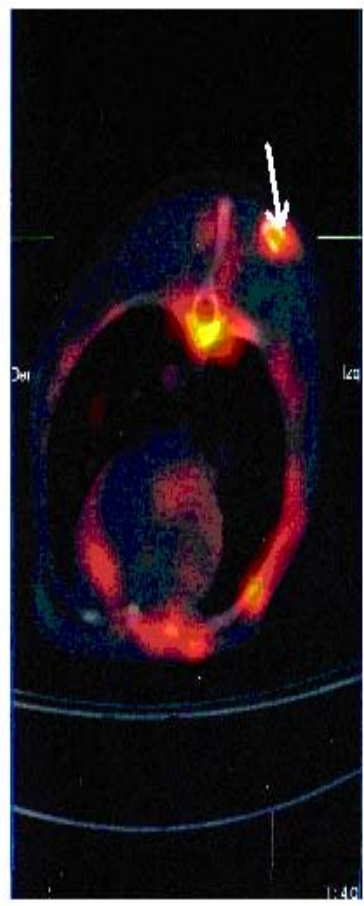
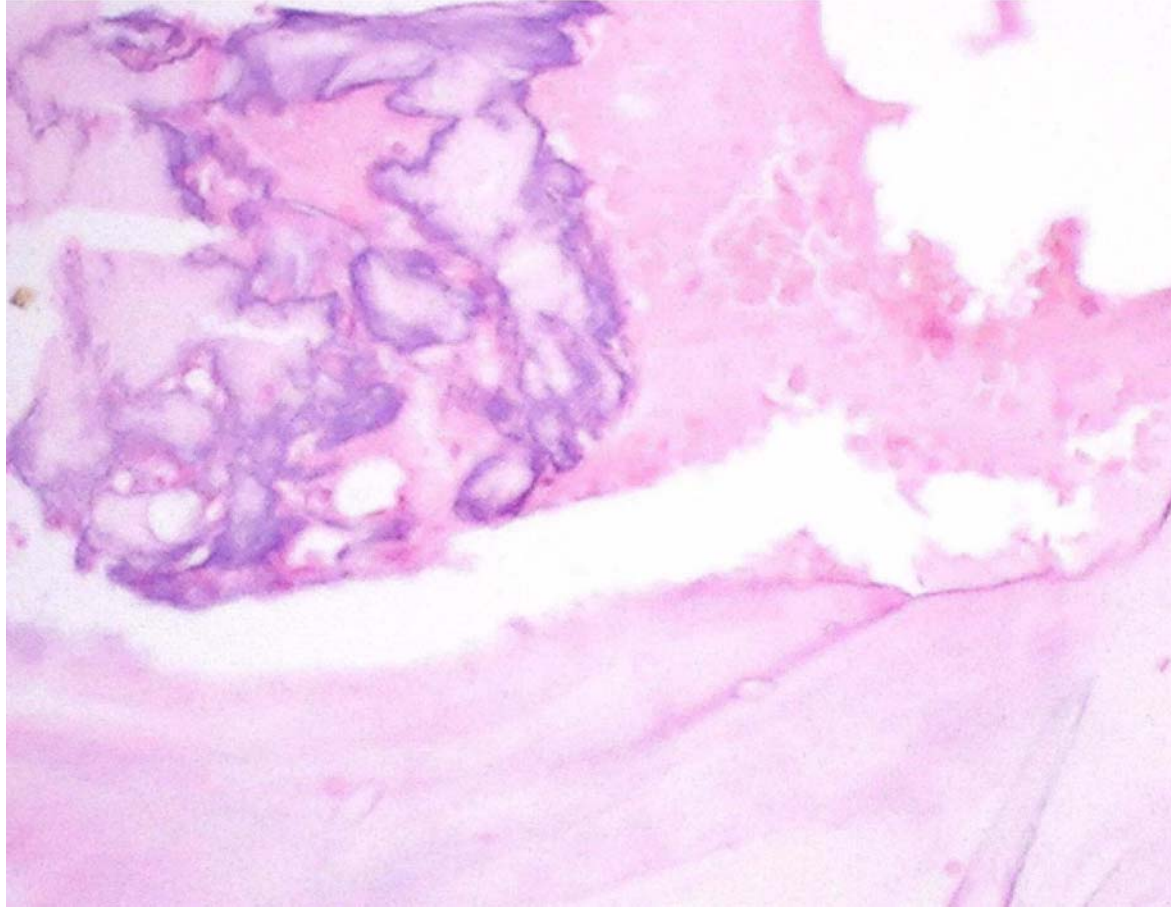


Figura 22.-Figura correspondiente al perro A. Se observa una trabécula ósea (parte inferior) y en el interior del espacio medular se identifica hueso inmaduro (más basófilo). Imágenes semejantes se



observaron en el perro B.

8 DISCUSIÓN

La reconstrucción ósea y en especial la reconstrucción mandibular es un problema recurrente y desafiante, ya que los procedimientos habituales con frecuencia se asocian a morbilidad y resultados subóptimos.

Existe evidencia creciente en el sentido que las células troncales en condiciones apropiadas pueden diferenciarse en células propias de los tejidos maduros, lo que abre la posibilidad de generar tejidos que substituyan los tejidos enfermos o los tejidos perdidos por razones traumáticas o quirúrgicas. Las células troncales mesenquimales, presentes en la médula ósea, tienen la capacidad de diferenciarse, entre otros tejidos, en tejido óseo.

En el caso de los tejidos óseos, los substitutos deben cumplir un rango de requerimientos para reemplazar el tejido óseo y su función. Idealmente deben tener propiedades osteoinductivas, osteoconductoras y osteogénicas. Un material osteoconductor provee el estímulo biológico para que las células progenitoras mesenquimales no diferenciadas se diferencien en osteoblastos. Aunque se han utilizado diferentes materiales sintéticos y naturales como moldes osteoinductores y osteo-conductores, presumimos que el mejor material osteoinductor y osteoconductor es el hueso mismo, que ha sido utilizado con cierto éxito en la reconstrucción de huesos pélvicos,⁷⁴ pero hasta ahora solo se ha descrito con resultados variables el uso de hueso homólogo de cadáver y heterólogo, principalmente bovino, para efectos de reconstrucción ósea, sin el uso concomitante de médula ósea roja.

La osteogénesis es definida como la capacidad para formar hueso nuevo y usualmente es obtenido mediante un material que contiene células capaces de diferenciarse en osteoblastos formadores de hueso.⁷⁵

El desarrollo del concepto de ingeniería de tejidos abrió otras posibilidades a la reconstrucción mandibular. Gronthos publicó un caso de reconstrucción mandibular exitoso en humano usando como molde una malla de titanio que relleno de hueso esponjoso del propio paciente, más colágena, hueso particulado y proteína morfogenética ósea (BMP) con el fin de propiciar la generación de hueso nuevo.^{76 77} ,

Aunque el procedimiento descrito por Gronthos es aplicable a los defectos debidos a tratamientos oncológicos, creímos que los resultados podrían ser mejorados usando como molde o material osteoconductor a la propia mandíbula del paciente, una vez esterilizada para eliminar los tejidos neoplásicos dejando solo la matriz ósea mineralizada, lo que tendría la ventaja de tener la forma y dimensiones exactas, obviando la necesidad de generar un molde a partir de imágenes por computadora que agregan complejidad y costos al procedimiento y eliminando la necesidad de recurrir a materiales sintéticos difíciles de obtener comercialmente. De la forma propuesta se aprovecha además las propiedades osteoinductivas y osteoconductoras del hueso y se elimina la necesidad de movilizar extensamente tejidos para una reconstrucción tradicional con un colgajo microvascularizado.

Formas similares de reconstrucción han sido utilizadas en la reconstrucción de hueso largos, sin embargo se ha utilizado células troncales expandidas ex vivo asociadas a moldes de hidroxiapatita⁷⁸ o hueso autólogo esterilizado en autoclave, irradiado y congelado, pero sin reconstitución con médula ósea autóloga.⁷⁹ Hasta donde sabemos no existen reportes previos del uso del propio hueso del paciente esterilizado con autoclave y reconstituido con médula ósea autóloga. Creemos que esta combinación podría eficientar los resultados obtenidos previamente, como lo sugiere nuestro experimento.

En nuestro modelo animal, y eventualmente en el uso clínico, la reconstrucción diferida mediante la instalación del injerto con relación al músculo dorsal ancho

daría la oportunidad de concluir el tratamiento oncológico, sin poner en riesgo de viabilidad del injerto y sin propiciar el crecimiento tumoral mediante el teórico

efecto paracrino de las células del injerto sobre las eventuales células tumorales residuales.

En el modelo propuesto podría aducirse que la viabilidad del injerto podría deberse a la migración de células de la médula ósea hacia el segmento reimplantado desde la mandíbula remanente, dificultando la evaluación de resultados. El modelo de reconstrucción diferida y la temporal ubicación en el músculo dorsal ancho cancelan esta posibilidad, demostrando que la viabilidad proviene de la médula ósea aplicada al injerto.

Se ha propuesto que los resultados pueden ser mejorados mediante el uso de factores tróficos (osteoinductores) como la proteína BMP usada por el grupo alemán o el uso de plasma rico en plaquetas (PRP) propuesto por Marx sobre hueso esponjoso, sin embargo, nuestro modelo no recurrió a dichos factores, lo que demuestra que no son estrictamente necesarios. Creemos que el hueso esterilizado, con cierto daño térmico, pudo proveer el estímulo suficiente a las células troncales mesenquimales para su diferenciación en osteoblastos sin necesidad de usar factores tróficos externos.

Si existe viabilidad, la matriz mineralizada ósea será reabsorbida y substituida con osteoide y matriz mineralizada nueva producida por los osteoblastos. Esto fue demostrando por la formación de osteoide en el estudio histopatológico y la detección de reacción osteoblástica en el estudio gamagráfico. El estudio gamagráfico es la forma habitual de demostrar la viabilidad ósea en pacientes sometidos a reconstrucciones con colgajos osteo-miocutáneos microvascularizados de peroné o cresta iliaca.⁸⁰

Creemos que los osteoblastos se originan de células progenitoras multipotenciales,⁸¹ una sub-población de las células troncales mesenquimales, presentes en la médula ósea, que consisten en fibroblastos capaces de

diferenciarse en varios tipos celulares, incluyendo osteoblastos, condrocitos, mioblastos y adipocitos.⁸²

Se ha descrito que las células troncales mesenquimales, bajo el estímulo adecuado, pueden diferenciarse en osteoblastos con la capacidad de producir osteoide y luego matriz calcificada a la par que inducen la formación de vasos nuevos.

Un aspecto muy importante, desde nuestro punto de vista, y con frecuencia ignorado es la angiogénesis, que sería el componente limitante de la viabilidad de la médula ósea y la eventual diferenciación de las células troncales mesenquimales en osteoblastos.⁸³

Creemos que las perforaciones practicadas al hueso fueron importantes favoreciendo la viabilidad de la médula ósea, ya que facilitaron el paso de vasos de neoformación al canal medular del injerto. Los resultados inconstantes con injertos óseos simples descritos podrían deberse a la dificultad para proveer la irrigación adecuada en los momentos críticos.

Podría aducirse que un experimento con tres animales representa una muestra pequeña, pero si consideramos que se logró inducir la viabilidad de un tejido inicialmente no viable en tres casos consecutivos, no se requieren grandes números para corroborar esto.

También se podría señalar que existe el riesgo de implantar tejido neoplásico luego de esterilización con autoclave, pero está claro que las células neoplásicas no se mantienen viables por más de 40 minutos a 60°C⁸⁴ y en nuestro estudio rebasamos con amplio margen dichas condiciones por lo que puede considerarse un procedimiento seguro.

En condiciones normales, la proliferación celular, diferenciación y migración de los osteoblastos está influenciada por una variedad de hormonas y factores de

crecimiento, cuyas complejas interacciones apenas empiezan a comprenderse. Los factores actúan sobre los pro-osteoblastos, por medio de receptores específicos que activan una cascada de señales intracelulares para inducir a las células a diferenciarse en osteoblastos maduros.

Los factores específicos de transcripción de los osteoblastos (runx2/core binding factor a1 y osteorix) están al final de las vías de señalización y son indispensables para el desarrollo de los osteoblastos y su diferenciación. La activación de estos factores de transcripción causan la expresión de una serie de genes que resultan en la producción de matriz extracelular caracterizada por la presencia de colágeno tipo I y osteoide (matriz ósea no mineralizada) y la expresión secuencial de patrones de enzimas como la fosfatasa alcalina y moléculas asociadas al hueso, como el colágeno tipo I, la osteopontina, osteocalcina y la sialoproteína ósea.⁸⁵

Además, los osteoblastos pueden diferenciarse en células óseas que cubren las superficies de hueso cortical y esponjoso, y también en osteocitos, localizados dentro de las lagunas del hueso cortical y que están conectados por sus largos procesos citoplasmáticos diseminados a través de la red de lagunas y canaliculos. Los osteocitos pueden sensor los cambios mecánicos y en los fluidos y mediante la sintetasa de óxido nítrico y toman parte en la regulación de la homeostasis de calcio y en la remodelación ósea.

Los osteoclastos también derivan de las células troncales hematopoyéticas y son células mononucleadas o multinucleadas que tienen receptores para la calcitonina y son capaces de resorber matriz ósea mineralizada mediante la producción de ácido y enzimas específicas.⁸⁶ A su vez, los osteoblastos producen un activador del receptor del ligando nuclear del factor-kappa B, el cual actúa sobre receptores específicos de pro-osteoclastos e inducen la diferenciación hacia osteoclastos.

Creemos que la esterilización podría proveer la lesión necesaria para desencadenar vías de señalización obligatorias para la diferenciación celular y la viabilidad ósea, tal vez a través de la exposición de ciertas proteínas de la matriz no mineral.

Nuestros resultados sugieren que este modelo es fácilmente reproducible y aplicable a la reconstrucción sin necesidad de recurrir a colgajos que producen

otros defectos tisulares mayores y puede ser aplicable a otros defectos óseos como los derivados de las resecciones de tumores óseos en las extremidades, lo que facilitaría su reconstrucción y eventual remodelación.

9 CONCLUSIONES

El autoinjerto esterilizado y reconstituido con médula ósea autóloga se mantiene viable, lo cual fue demostrado en el presente trabajo, alcanzándose el objetivo planeado. Esto abre fundadas esperanzas a la aplicación del procedimiento en la reconstrucción ósea en forma sencilla y reproducible, sin embargo, se requiere un estudio clínico para corroborar estos hallazgos.

9 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ World Cancer Report. World Health Organization, 2007.
- ² Dirección General de Epidemiología. Secretaria de Salud. Compendio del Registro Histopatológico de las Neoplasias en México. Mortalidad y Morbilidad 2002.
- ³ Cooper JS, Pajak TF, Forastieri A, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high risk squamous –cell carcinoma of the head and neck. *New Engl J Med* 2004; **350**: 1937-44
- ⁴ Bernier J, Domeneghe C, Ozhamin M, Matuszeka K., Lefebvre J, Greiner R. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *New Engl J Med* 2004; **350**:1945-52
- ⁵ Cordeiro PG, Santamaría E, Disa J. Mandible reconstruction. In cancer of the head and neck. Jatin Sha. BC Decker, 2001. Primera ed. Hamilton, Ontario.
- ⁶ Urken M. Recipient vessel selection in free tissue transfer to the head and neck. In Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. Mark Urken, Cheney ML, Sullivan M, and Biller. Raven Press.1995. New York.
- ⁷ Urken M. Iliac crest osteo cutaneous and oxeomusculocutaneous. In Atlas of regional and free flaps for head and neck reconstruction. Mark Urken, Cheney ML, Sullivan M, and Biller. Raven Press.1995. New York
- ⁸ Vacanti JP, Langer JP: Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 1999; **354** (suppl): 32-34
- ⁹ Wang X, Puram S. Toughness of cortical bone and its relationship with age. *Ann Biomed Eng.* 2004; **32**:123-35.
- ¹⁰ Jilka RL, Biology of the basic multicelular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol.* 2003; **41**:182-5
- ¹¹ Aubin JE, Heersche JN. Bone cell biology: osteoblasts, osteocytes and osteoclastos. In Glourieux FH, Pettifer JM, Hupnner H. Editors. *Pediatric bone.* San Diego: Elsevier Science; 2002
- ¹² Parfitt AM. Osteonal and hemiosteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult bone. *J Cell Biochem,* 1994; **209**:29-39

- ¹³ Nagy A, Gocza E, Diaz EM. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*. 1990; **110**:815-21
- ¹⁴ Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; **90**: 8424-8
- ¹⁵ Yamashita J, Itoh H, Hirashima M. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*. 2000; **408**:92-6
- ¹⁶ Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2000; **18**:675-9
- ¹⁷ Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*. 2001; **292**:1389-94. [Erratum, *Science* 2001; **293**:428.
- ¹⁸ Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*. 2003; **300**: 1251-6.
- ¹⁹ Shambloott MJ, Axelman J, Littlefield JW. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; **98**:113-8
- ²⁰ Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 2002; **418**:50-6
- ²¹ Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 2000; **227**:271-8
- ²² Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med*. 2000; **6**:88-95
- ²³ Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; **97**:11307-12
- ²⁴ Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001; **19**: 1134-40
- ²⁵ Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; **414**:105-11.

- ²⁶ Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000; **100**:157-68
- ²⁷ Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med*. 1997; **3**:1337-45
- ²⁸ Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; **96**:14482-6
- ²⁹ Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000; **6**:1229-34
- ³⁰ McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99**:1341-6.
- ³¹ Krause DS, Theise ND, Collector MI. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001; **105**:369-77
- ³² Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weismann IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*. 2002; **297**:2256-9
- ³³ Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001; **19**:180-92
- ³⁴ Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000; **251**:3-11
- ³⁵ Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001; **7**:259-64
- ³⁶ Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002; **105**:93-8.
- ³⁷ Orlic D, Kajstura J, Chimenti S. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001; **410**:701-5
- ³⁸ Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;**7**:430-6

- ³⁹ Orlic D, Kajstura J, Chimenti S. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:10344-9
- ⁴⁰ Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001; **105**: 829-41.
- ⁴¹ Kuehnle I, Goodell MA. The therapeutic potential of stem cells from adults. *BMJ*. 2002; **325**:372-6
- ⁴² Tsonis PA. Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiation*. 2002; **70**:397-409
- ⁴³ Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 1999; **283**: 534-7
- ⁴⁴ Galli R, Borello U, Gritti A. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2000;**3**:986-91
- ⁴⁵ Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, van der Kooy D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med*. 2002; **8**:268-73
- ⁴⁶ Theise ND, Krause DS, Sharkis S. Comment on "Little Evidence for Developmental Plasticity of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Science*. 2003; **299**:1317
- ⁴⁷ Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999;**401**:390-4
- ⁴⁸ Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol*. 2002; **3**:323-8
- ⁴⁹ Deasy BM, Qu-Peterson Z, Greenberger JS, Huard J. Mechanisms of muscle stem cell expansion with cytokines. *Stem Cells*. 2002; **20**:50-60
- ⁵⁰ Kanczler JM, Oreffo ROC. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. *Eur Cells and Materials*. 2008; **15**: 100-114.
- ⁵¹ Gronthos S. Reconstruction of human mandible by tissue engineering. *Lancet*. 2004: **364** (9436): 735 – 736
- ⁵² Warnke PH, Springer ING, Aci WI, Eufinger AH, Wehmaller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet*. 2004; **364**:766-70.

- ⁵³ Brown J. Mechanisms of cancer invasion of the mandible. *Curr Opin in Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; **11**: 96-102.
- ⁵⁴ Lydiatt DD. Mandibular resection. *Head and neck*, 1995; **3**: 247-51.
- ⁵⁵ Brown JS, Kalavrezos N, D'Souza J, Lowe D, Magennis P, Woolgar. Factors that influence the method of Mandibular resection in the management of squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillof Surg* 2002; **40**: 275-84.
- ⁵⁶ Adekeye EO. Reconstruction of mandibular defects by autogenous bone grafts: a review of 37 cases. *J Oral Surg.* 1978 Feb; **36**(2): 125-8
- ⁵⁷ Frame JW, Edmondson HD, Furniss A. Mandibular reconstruction using split autogenous bone grafts. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1987 Feb; **25**(1): 1-8
- ⁵⁸ Freidel M, Seguin P, Beziat JL, Dumas P. Excision of ameloblastoma and reconstruction using a mandibular autologous graft. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 1984; **85**(4): 267-72
- ⁵⁹ Serafin D. *Atlas of Microsurgical Composite Tissue Transplantation.* WB Saunders Company. 1996.
- ⁶⁰ Rivas B, Carrillo JF, Granados-García M. Oromandibular reconstruction for oncological purposes. *Ann Plast Surg* 2000, **44**:29-35.
- ⁶¹ Serafin D. *Atlas of Microsurgical Composite Tissue Transplantation.* WB Saunders Company. 1996.
- ⁶² Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of the use in the preparation of future sires for implants. *Int J Oral Maxillof Implants* 1999, **14**; 529,
- ⁶³ Fenis JPM, Stoelinga PJW, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a clinical and a radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; **31**: 281-286
- ⁶⁴ Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP. Effects of platelet rich plasma on bone growth and ossteointegration in human maxillary sinus grafts. Three bilateral case reports. *Int J Periodont Restor Dent* 2002; **22**: 45
- ⁶⁵ Issack PS, Di Cessare PE. Recent advances toward the clinical application of bone morphogenetic proteins in bone and cartilage repair. *Am J Orthop Surg* 2003; **32**: 42-36
- ⁶⁶ Slater M, Patava J, Kinham K. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* 1995; **13**: 655

- ⁶⁷ Marx RE. Platelet-Rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; **62**: 489-496
- ⁶⁸ Smajilagic A, Al-Khalil MY, Redjic A, Filipovic S, Hadjuhasanovic B, Lappalainen S. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 and bone marrow as a substitute for bone graft in reconstruction defect of rabbit mandible. *Saudi Med J*. 2005; **26**(9): 1398-1402
- ⁶⁹ Blanc JL, Lagier JP, Cheynet F, Chossegras C, Bachelier Y, Casanova D. Cancellous mandibular autografts and titanium mesh. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 1990; **91**(5): 344-8
- ⁷⁰ Wilson GW, Bosack RC. Reconstruction after hemimandibulectomy using a costochondral rib graft and a dacron-urethane tray with autogenous iliac bone: report of a case. *J Oral Maxillofac Surg*. 1988 Feb; **46**(2): 138-42
- ⁷¹ Berkman MD, Rothschild D, Trieger N, Goldman A. Clinical application of the functional matrix: mandibular reconstruction and monobloc functional therapy. *J Am Dent Assoc*. 1978; **96**(4): 645-50
- ⁷² Carlson ER, Marx RE. Part II. Mandibular reconstruction using cancellous cellular bone grafts. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996; **54**(7): 889-97
- ⁷³ Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft. Case series. *J Periodontol* 2000; **71**: 1654.
- ⁷⁴ Dae-Geun Jeon, Min Suk Kim, Wan Hyeong Cho, Won Seok Song, Soo-Yong Lee. Reconstruction with Pasteurized Autograft-Total Hip Prosthesis Composite for Periacetabular Tumors. *Journal of Surgical Oncology* 2007; **96**:493–502.
- ⁷⁵ Miller MJ. Osseous tissue engineering in oncologic surgery. *Sem Surg Oncol* 2000; **18**: 294-301.
- ⁷⁶ Gronthos S. Reconstruction of human mandible by tissue engineering. *Lancet*. 2004; **364** (9436): 735 – 736
- ⁷⁷ Warnke PH, Springer ING, Aci WI, Eufinger AH, Wehmaller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet*. 2004; **364**:766-70.
- ⁷⁸ Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R et al. Repair of large bones with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J. Med*. 2001; **344**; 385-6

⁷⁹ Ewers R, Wangerin K. The autoclaved autogenous reimplant, an immediately replaced, mineral frame. *Maxillofac Surg.* 1986 Jun; **14**(3): 138-42.

⁸⁰ Bergstedt HF, Karloff B, Lind MG, Wersall J. Scintigraphy of human autologous rib transplants to a partially resected mandible. *Scand J Plast Reconstruct Surg.* 1978; **12**(2): 151-6.

⁸¹ Aubin JE, Heersche JN. Bone cell biology: osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. In Glourieux FH, Pettifer JM, Hupner H. Editors. *Pediatric bone.* San Diego: Elsevier Science; 2002.

⁸² Parfitt AM. Osteonal and hemiosteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult bone. *J Cell Biochem,* 1994;**209**:29-39

⁸³ Kanczler JM, Oreffo ROC. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. *Eur Cells and Materials.* 2008; **15**: 100-114.

⁸⁴ Dae-Geun Jeon, Min Suk Kim, Wan Hyeong Cho, Won Seok Song, Soo-Yong Lee. Reconstruction with Pasteurized Autograft-Total Hip Prosthesis Composite for Periacetabular Tumors. *Journal of Surgical Oncology* 2007; **96**: 493–502.

⁸⁵ Wang X, Puram S. Toughness of cortical bone and its relationship with age. *Ann Biomed Eng.* 2004; **32**:123-35

⁸⁶ Rouselle AV, Heyman D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* 2002; **30**: 533-40

□ 梳最甄赫楸.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....