
ANALISIS DE LAS TENDENCIAS ACTUALES EN EL USO DE
ADITIVOS QUIRURGICOS PARA LA ESTIMULACION DE LA
NEOFORMACION OSEA EN CIRUGIA PERIIMPLANTAR

RODRIGO H. STOEHR

JULIO DE 2007

Este trabajo tiene como objeto recopilar información referente a los últimos avances en las técnicas utilizadas para la obtención y utilización de aditivos quirúrgicos destinados a la regeneración ósea y la ingeniería tisular, ya sea en etapa experimental o clínica, aportando, cuando sea necesario, conceptos básicos de histofisiología, genética, etc., para la mejor comprensión de las técnicas aquí analizadas. Consta de una extensiva revisión bibliográfica, de libros de texto de diversas áreas, libros específicos de cirugía implantológica y numerosas publicaciones que describen trabajos experimentales de nuestro interés. A tal efecto al comienzo de cada análisis, se indican las referencias bibliográficas correspondientes, que son detalladas al final del trabajo.

Por último, se incluyen cuando es necesario, imágenes también recopiladas en la bibliografía utilizada (y algunas de obtención propia), para la mejor comprensión de lo explicado, indicando la procedencia de las mismas, cuando es pertinente.

Las técnicas analizadas son:

- Diversos concentrados plaquetarios de uso quirúrgico con especial hincapié en el plasma rico en plaquetas (cPRP) y Fibrina rica en plaquetas (PRF).
- Las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) en sus distintas formas.
- La terapia génica, de reciente aplicación para el fin que revisamos, pero muy prometedora en el largo plazo.
- La manipulación y cultivo de células osteogeneradoras, con sus distintos enfoques, también muy promisorio, pero en un plazo no muy cercano, dada la diversidad de resultados obtenidos por los diversos equipos que han optado por esta línea de trabajo.

En este contexto, para introducir al tema de concentrados plaquetarios, se hace una breve descripción de la estructura y función de las plaquetas.

CARACTERISTICAS HISTOFISIOLOGICAS DE LAS PLAQUETAS

(1)

Las plaquetas, distan de poder ser consideradas células, por ello se las llama elementos figurados o formes de la sangre, ya que son en realidad fragmentos citoplasmáticos de una célula mayor, contenida en la médula ósea denominada “megacariocito”, esta última pertenece a la misma línea celular de los restantes elementos de la sangre cuyo precursor común es el “hemocitoblasto”.

Poseen en su citoplasma periférico una zona denominada hialómero compuesta por una serie de sacos y túbulos que comunican con el exterior y una zona central denominada cromómero que contiene los gránulos poseedores de todos los factores químicos responsables de las múltiples funciones de las plaquetas. El hialómero contiene también filamentos de actina y moléculas de miosina, responsables de la formación de prolongaciones finas y de la contracción de las plaquetas durante la agregación plaquetaria ante la ruptura de un vaso. Por fuera de su membrana citoplasmática posee una fina capa rica en glucoproteínas y glucosaminoglicanos responsables de la adhesividad de las plaquetas y que actúan también como receptores de diversas sustancias mensajeras para su estimulación o inhibición. Los gránulos contenidos en la zona central, son de tres tipos: los gránulos δ o “densos”, que almacenan sustancias no proteicas como ADP y ATP, además de serotonina. Los gránulos α son algo mayores y almacenan todas las citoquinas de interés para el uso que analizamos y que enumeraremos más adelante. Por último, los gránulos λ son lisosomas corrientes y contienen las enzimas comunes típicas de estas organelas.

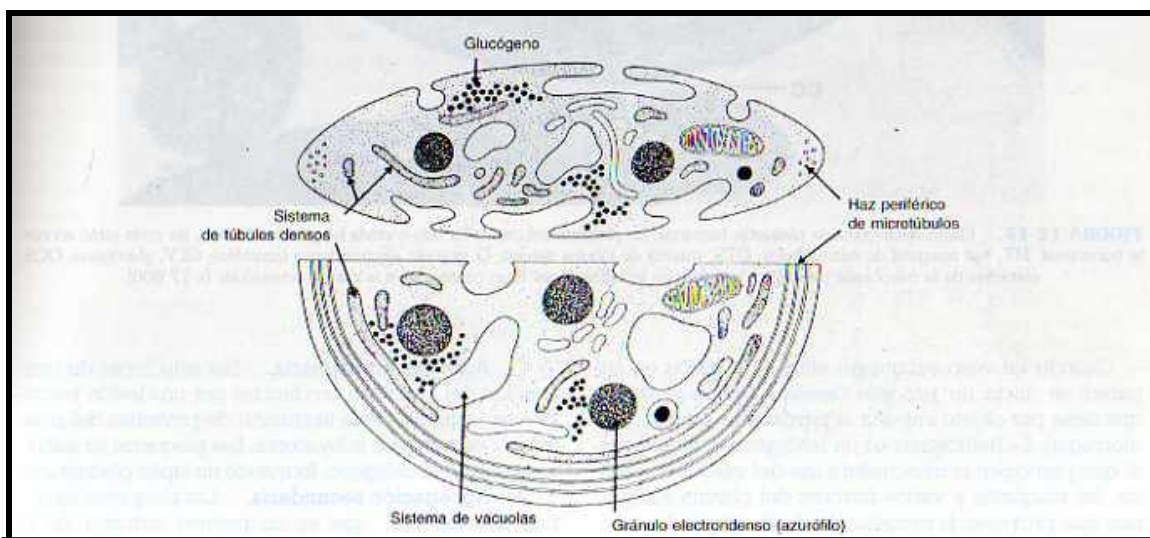


Figura 1 (tomada de Junqueira y col, 5° ed): esquema de ultraestructura de las plaquetas

El tamaño de las plaquetas es de 2 a 4 μ de diámetro y la concentración normal es de 200.000 a 400.000 por mm^3 de sangre.

Son las responsables de la hemostasia, en ella intervienen de la siguiente manera:

- Agregación primaria:

Al producirse una solución de continuidad en el endotelio vascular, las proteínas del plasma se adhieren al colágeno subyacente al endotelio e inmediatamente las plaquetas hacen lo mismo.

- Agregación secundaria:

Las plaquetas del tapón liberan ADP, que es un potente inductor de la agregación plaquetaria, atrayendo un mayor número de las mismas al tapón.

- Coagulación de la sangre:

Durante la agregación de las plaquetas, factores del plasma sanguíneo, de los vasos lesionados y contenidos en los gránulos de las plaquetas, desarrollan una interacción secuencial, conocida como "cascada" que desemboca en la activación del fibrinógeno del plasma, pero también contenido en los gránulos α de las plaquetas, formando una red fibrosa tridimensional que aprisiona tanto hematíes (glóbulos rojos), leucocitos (glóbulos blancos) y plaquetas, esto es el coágulo sanguíneo, mas consistente y estable que el tapón plaquetario.

- Retracción del coágulo:

Inicialmente el coágulo sobresale en el interior del vaso, pero después se contrae notablemente, gracias a la acción de la actina, miosina y ATP del coágulo. Es en esta etapa en que sobreviene la mayor actividad de degranulación de las plaquetas, con la consiguiente liberación de las citoquinas contenidas en los gránulos α

- Eliminación del coágulo:

La proenzima plasminógeno es transformada en plasmina gracias a factores liberados por el endotelio vascular reconstituido, esta, junto a otras enzimas liberadas por los gránulos λ de las plaquetas, destruyen la red de fibrina del coágulo.

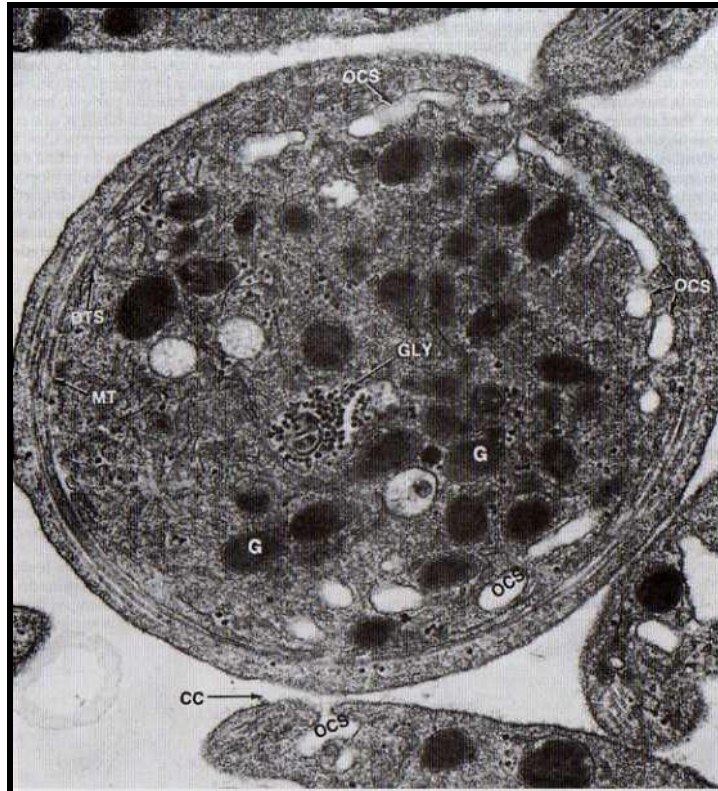


Figura 2: (tomada de Junqueira y col., 5° ed):
fotomicrografía de plaquetas a MET



Figura 3: fotografía (MO) de los elementos formes de la sangre, en el centro, nucleado, un leucocito (12 μ aprox.), los pequeños elementos basófilos en el plasma son las plaquetas (2 a 4 μ), el resto son glóbulos rojos (8 μ)

Veremos ahora cuales son las citoquinas contenidas en los gránulos α de las plaquetas, de interés para éste análisis.

Factor De Crecimiento Plaquetario Derivado

(1), (3), (5), (6), (7), (8), (9), (10).

También llamado **PDGF**, por sus siglas en ingles (*Platelet derived growth factor*). Es un polímero dimérico formado por dos cadenas llamadas A y B. Su codificación genética se encuentra albergada en los cromosomas 7 y 21. Si bien está contenido principalmente en las plaquetas, lo encontramos también en otras células como macrófagos, células endoteliales, monocitos y fibroblastos.

Su acción se lleva a cabo por la interacción con receptores específicos de las células blanco de dos tipos, llamados α y β , los primeros son los responsables de la mitogénesis, mientras que los β se relacionan con la quimiotaxis principalmente de los precursores de las células osteoblásticas. Por estos mecanismos, estimula principalmente la angiogénesis, el intermediario de esta acción es el macrófago, el cuál frente a la presencia del PDGF, libera factores estimuladores de esta acción. Además, al favorecer la quimiotaxis, atrae a las células precursoras del osteoblasto, dicho esto debemos recalcar que por si solo, el PDGF no puede inducir la diferenciación posterior de estas células, para esto son necesarias específicamente las proteínas morfogenéticas, que analizaremos más adelante. Sí se sabe que a nivel de tejidos blandos, activan la mitogénesis en dirección fibroblástica, favoreciendo la cicatrización de la herida quirúrgica en la mucosa bucal. Recordemos además que la precursora de todas estas células (fibroblasto, osteoblasto, endotelial) es la misma, la "Mesenquimática", por lo que la acción quimiotáctica y mitogénica sobre esta célula favorece a todos los procesos ya mencionados.

Factor Transformador De Crecimiento

(1), (2), (3), (5), (6), (7), (8), (9), (10).

Su abreviatura es **TGF- β** (*Transforming growth factor*). Esta es en realidad una vasta superfamilia de citoquinas, de la cual se conoce unos 30 integrantes, entre ellos las BMP y otros agentes como la “Activina”, agente liberadora por la notocorda embrionaria para inducir la formación de la placa neural en el ectodermo y también para la formación de las somitas por parte del mesodermo adyacente a ella (mesodermo paraaxial), responsable de la formación del esqueleto axial en el embrión. De toda la familia mencionada, las formas aisladas en los gránulos α de las plaquetas, son **TGF- β 1** y **TGF- β 2**, principalmente la primera, ya que su concentración es decididamente más elevada. Ambas citoquinas han sido encontradas también, como producto de síntesis además de las plaquetas, en macrófagos, osteoblastos y en algunos leucocitos, como los linfocitos y granulocitos neutrófilos. Las dos formas tienen una acción similar, si bien los resultados encontrados en distintas publicaciones, son disímiles al respecto. Se sabe que poseen acción mitogénica y quimiotáctica sobre células mesenquimáticas, preosteoblastos y fibroblastos, también que pueden inhibir a los osteoclastos, pero otros autores consideran que poseen una fuerte acción estimuladora sobre las células que sintetizan colágeno, principalmente del tipo 1 y fibronectina. Lo cierto es que dada la variedad de efectos encontrados, en algunos casos opuestos entre sí, es razonable pensar que su acción va en relación directa con el microambiente en el que se encuentren, como es sabido, sucede con las BMP, tan relacionadas químicamente con estas citoquinas. Existen autores que las consideran “reguladores de la inflamación” por su papel en la cicatrización fibrosa. En el ambiente óseo, su función está relacionada entonces con el apoyo al remodelado óseo y la maduración de un injerto.

Factor Símil Insulina De Crecimiento

(1), (3), (5), (6), (7), (8), (9), (10).

Se lo conoce como **IGF** (*Insulin like growth factor*). Esta constituido en realidad por dos factores: **IGF-1** e **IGF-2**, por ello es posible encontrarlos con la abreviatura "**IGFs**". Ambos son producidos por los osteoblastos y los encontramos en los gránulos α de las plaquetas y contenidos en la matriz ósea. Son inductores de mitosis en los preosteoblastos y estimulan la síntesis de colágeno por parte de los osteoblastos existentes. Al estar contenidos en la propia matriz ósea, la acción de los osteoclastos los libera permitiendo su acción sobre la línea osteoblástica, de esta manera compensa la acción de los osteoclastos. Otra acción bien conocida de las **IGFs**, es su capacidad para proteger y prolongar la sobrevivencia de distintos tipos celulares; esto lo realiza mediante la regulación de la apoptosis (muerte celular programada), es decir inhiben la destrucción de las células cuyas señales indican que deben ser destruidas. Aplicado esto a injertos, sobre todo de hueso autólogo, favorecería la sobrevivencia de las células que no fueron destruidas por la hipoxia y la manipulación desde que se corta en el sitio dador hasta que se coloca en el lecho receptor. Esta función es favorable en la mayoría de los casos, pero se sabe que es perjudicial en el caso de neoplasias, se sabe en efecto, que las células tumorales utilizan estas citoquinas como uno de los tantos mecanismos para incrementar su potencial de supervivencia ante el ataque de células de defensa.

Otras Citoquinas Plaquetarias

(1), (3), (5), (6), (7), (8), (9), (10).

Existen otra serie de factores almacenados en los gránulos α de las plaquetas, algunos específicos como la β -tromboglobulina (no importante para nuestro uso), u otros factores de crecimiento que indirectamente colaboran con el fin buscado como son el "Factor de crecimiento epitelial" (**EGF**) o el "Factor de crecimiento vascular endotelial" (**VEGF**), quienes respectivamente colaboran en la reepitelización de la herida quirúrgica y el segundo en la revascularización de injertos. Además existen dentro de estos gránulos otras citoquinas no específicas de las plaquetas como son el fibrinógeno, la tromboplastina y otros factores de la coagulación; factores no

relacionados con la coagulación con los inhibidores de la fibrinólisis, la fibronectina e inmunoglobulinas entre otros.

Hecho este análisis, pasamos a revisar las distintas modalidades de uso actual de concentrados plaquetarios destinados regeneración ósea guiada (**GBR**).

El concentrado más utilizado es el **cPRP** (Concentrado de plasma rico en plaquetas), este será el que analizamos primero.

CONCENTRADO DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS

(1), (3), (5), (6), (7), (8), (9), (10).

también conocido por su abreviatura (**cPRP**) o simplemente **PRP**, tiene como finalidad, concentrar en una masa reducida, la mayor cantidad de plaquetas posible y con ellas una alta concentración de factores de crecimiento contenidos en sus gránulos.

La técnica utilizada para su obtención ha variado a lo largo de los años.

Una primera técnica utilizaba un volumen de sangre de alrededor de 400 a 500 ml de sangre propia del paciente, recolectada generalmente el día anterior a la intervención quirúrgica. Otra técnica más “ambulatoria” utilizada de manera más corriente, implica la obtención de hasta 50 o 60 ml de sangre periférica el mismo día de la intervención. La utilización de volúmenes mayores a este, se limita hoy en día a intervenciones no ambulatorias para reconstrucciones mayores como son las postoncológicas.

Técnica para la obtención:

Con la sangre recolectada, se agrega un anticoagulante (como el citrato trisódico) y se coloca en tubo de ensayo en centrífuga a 5600 rpm. Se logra así una solución formada por tres fases: la superior, que representa del 40 al 50% del volumen total es el llamado “Plasma pobre en plaquetas” (**PPP**), rico en todos los componentes solutos del plasma, pero carente de elementos formes de la sangre incluidas las plaquetas. En el fondo del tubo queda una solución compuesta casi exclusivamente por glóbulos rojos y blancos, que representa hasta el 55% del volumen total contenido en el tubo. En medio de ambas fases, representando apenas un 5% del

volumen, encontramos la mayor concentración de plaquetas. En esta etapa, es imposible separar la fase intermedia de la superior, por esto el operador aspira con una jeringa la fase superior (PPP) junto con la intermedia y en términos generales algo de la porción superior de la fase compuesta por los glóbulos rojos, en parte por que la aspiración inevitablemente los arrastra, por otro lado se sabe que esta porción también tiene un alto contenido de plaquetas. Esta muestra depurada es sometida a una segunda centrifugación, en el caso de la técnica que describimos, será de 2400 RPM, si bien otros autores indican que esta centrifugación será más enérgica que la primera, denominándolas “Soft spin” a la primera y “Hard spin” a la segunda. Nuevamente se obtiene una separación de PPP en la parte superior, que representa un 80% del volumen y PRP en la inferior, en el fondo del tubo, una mínima fracción de glóbulos rojos que algunos autores sostienen que debe mezclarse con el PRP ya que sigue teniendo una concentración muy elevada de plaquetas, en esta etapa es fácil separar y descartar el PPP dejando en el tubo la fracción de interés (figura 4). Como sea, se ha comprobado que la muestra resultante de PRP contiene una concentración de un 300 a 400% superior a la normal en sangre de plaquetas (en un rango de 600.000 a 1.100.000 por mm^3).

Al momento de ser utilizado, el cPRP será activado con trombina de origen bovino y cloruro de calcio (el calcio es necesario para que ocurra la reacción enzimática promovida por la trombina de transformación del fibrinógeno en fibrina. Se obtiene así un gel relativamente fácil de manipular (Fig. 5), compuesto por una trama cerrada de fibrina en la cual se encuentran atrapadas las plaquetas. Mas importante todavía que lo anterior, como consecuencia de esta activación, ocurre la rápida degranulación de las plaquetas, dejando disponibles los factores de crecimiento y demás citoquinas en este gel.

Esta etapa es la que lleva a la búsqueda de otros preparados plaquetarios, distintos al cPRP, por las razones que veremos a continuación.

La problemática legal en algunos países de Europa respecto de la utilización de concentrados plaquetarios o derivados sanguíneos en general, no es menor. En países como Italia, no está permitido la utilización o manipulación de sangre y hemoderivados fuera del ámbito hospitalario público, por lo que en la práctica privada, los concentrados plaquetarios teóricamente no pueden usarse, esto con fines transfusionales, pero aún cuando esto preparados no tienen ese fin, se

encuentran enmarcados en esa prohibición. En otros como Francia, es ilegal la utilización de trombina de origen animal. Por lo que la técnica de obtención del cPRP

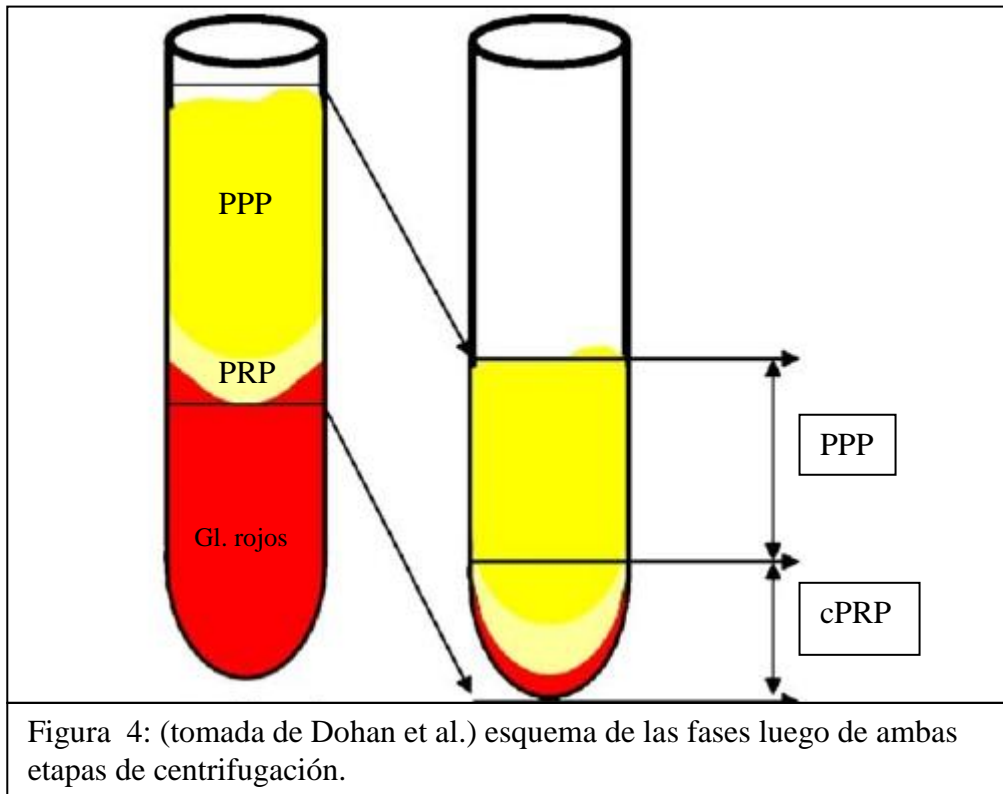


Figura 4: (tomada de Dohan et al.) esquema de las fases luego de ambas etapas de centrifugación.



Figura 5: coágulo de cPRP listo para ser posicionado en el lecho quirúrgico

es técnicamente imposible de utilizar en esos países. A raíz de esto desde hace ya varios años se vienen investigando y desarrollando varias formas distintas de concentrados plaquetarios que no se topen con este inconveniente. A modo de ejemplo, se describirá el **PRF** (*Fibrina rica en plaquetas*) y se mencionaran otros al final de ese análisis.

FIBRINA RICA EN PLAQUETAS (PRF)

(6), (7), (8), (9), (10).

Esta técnica implica la no utilización de trombina bovina, por lo que tampoco se anticoagula la muestra obtenida, entonces, en resumidas cuentas, no es más que sangre centrifugada. Fue desarrollada por Choukroun et al. Y publicada en el 2000. Posteriormente fue cuidadosamente analizada por Dohan et al. Y publicado en el 2004.

La técnica consiste en colocar la sangre obtenida no anticoagulada en un tubo de 10 ml e inmediatamente centrifugada a 3000 rpm. durante 10 minutos. La ausencia de anticoagulantes implica que en pocos minutos, por el contacto con la pared del tubo, se activan las plaquetas liberando los factores de la coagulación que iniciarán la activación del fibrinógeno, es decir que la trombina e inclusive el calcio necesarios para esta reacción serán los contenidos en la propia sangre del paciente, el tiempo resultante que llevará la coagulación será entonces mucho mayor que en otras técnicas de cPRP. Como consecuencia de la centrifugación, el fibrinógeno es inicialmente concentrado en la parte superior del tubo, antes de que la trombina circulante lo active en fibrina. Luego al comenzar la coagulación, se separa en la porción superior el suero (plasma sin los componentes de alto peso molecular) a esta fase también se la menciona como PPP (Fig. 6), aunque en realidad sea solo suero y no reúna características de plasma. Una vez formado el coágulo, solo queda separarlo de la porción inferior roja, cortándola con una tijera, de la misma manera que en la técnica del cPRP, los autores preconizan preservar la parte superior de la fase roja, dada su elevado contenido de plaquetas(Fig. 7).

Ventajas y desventajas del PRF

Quienes describen y preconizan este concentrado, sostienen y demuestran que reúne numerosas ventajas respecto del **cPRP**. Por el lado legal, como ya dijimos, posibilita su utilización en países donde el uso de trombina de origen animal está prohibido.

Respecto a la estructura del coagulo, sostienen que la rápida y brusca coagulación a la que se somete al **cPRP**, tiene como consecuencia una rápida formación de la red de fibrina, sin interactuar con moléculas de fibronectina y de glicosaminoglicanos, lo que le daría mayor estabilidad en el tiempo y mayor elasticidad. Como consecuencia de esa misma celeridad que también induce la rápida degranulación de las plaquetas, las citoquinas o factores de crecimiento útiles para el fin buscado, quedarían atrapadas en la trama de fibrina de manera extrínseca, es decir no quedan incluidas en la fibras mismas de la fibrina, de manera intrínseca(Fig.8).

Siempre de acuerdo a los autores de la técnica, esta trama carente de puentes con otras moléculas distintas a la fibrina, hacen que la reabsorción de este coágulo de fibrina sea llevada a cabo mucho más rápido. Como consecuencia de esto, la disponibilidad in situ de estos factores plaquetarios sería a muy corto plazo.

Por otro lado, al demostrar que la lenta coagulación del **PRF** posibilita la formación de puentes en la trama de fibrina por parte de fibronectina y las cadenas de glucosaminoglicanos y que, en estas quedan atrapadas de manera intrínseca (Fig. 9), las moléculas de los factores de crecimiento de las plaquetas, además de que no todas las plaquetas son rápidamente inducidas en su degranulación; indican que la elasticidad y estabilidad en el tiempo de este concentrado es muy superior a la del **cPRP**, propiciando esto una liberación más lenta y por lo tanto una acción más prolongada en el tiempo por parte de las citoquinas plaquetarias. La elasticidad superior comentada anteriormente, hace al PRF más apto para su utilización como membrana autóloga. (Fig. 10)

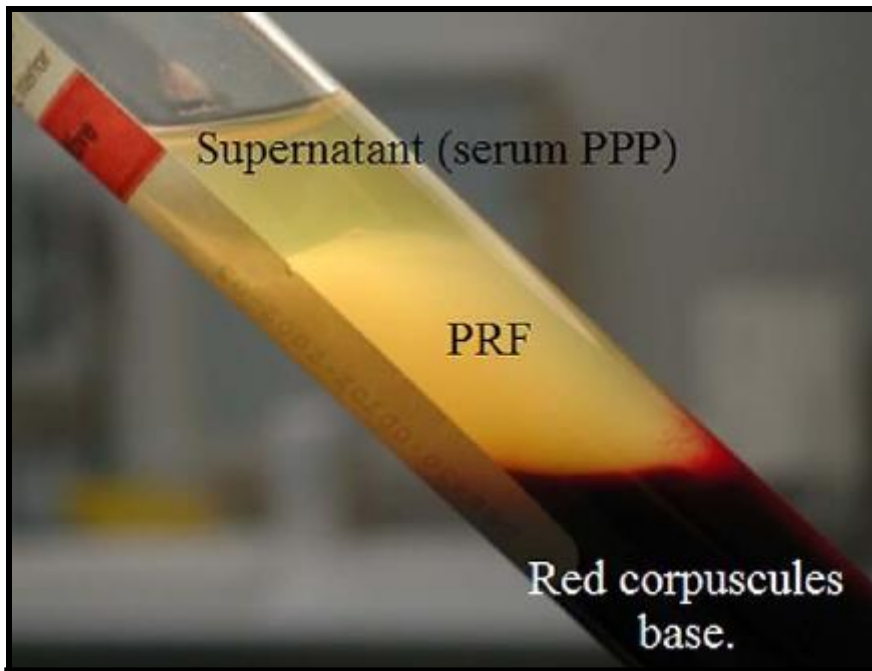


Fig. 6 (tomada de Dohan et al): Fases del PRF luego de su único ciclo de centrifugación.

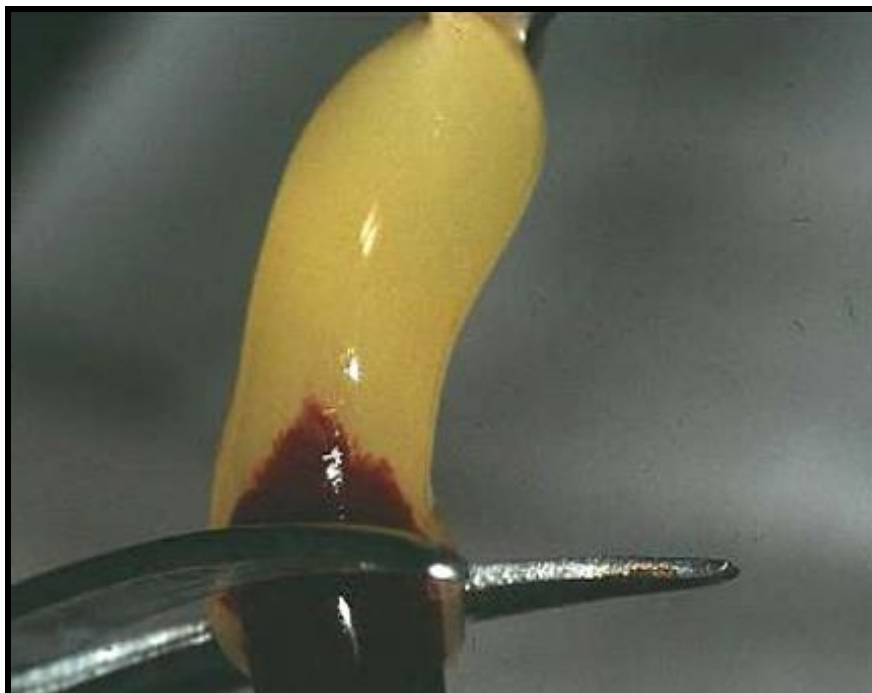


Fig. 7 (tomada de Dohan et al.): separación del PRF de la fase roja inferior

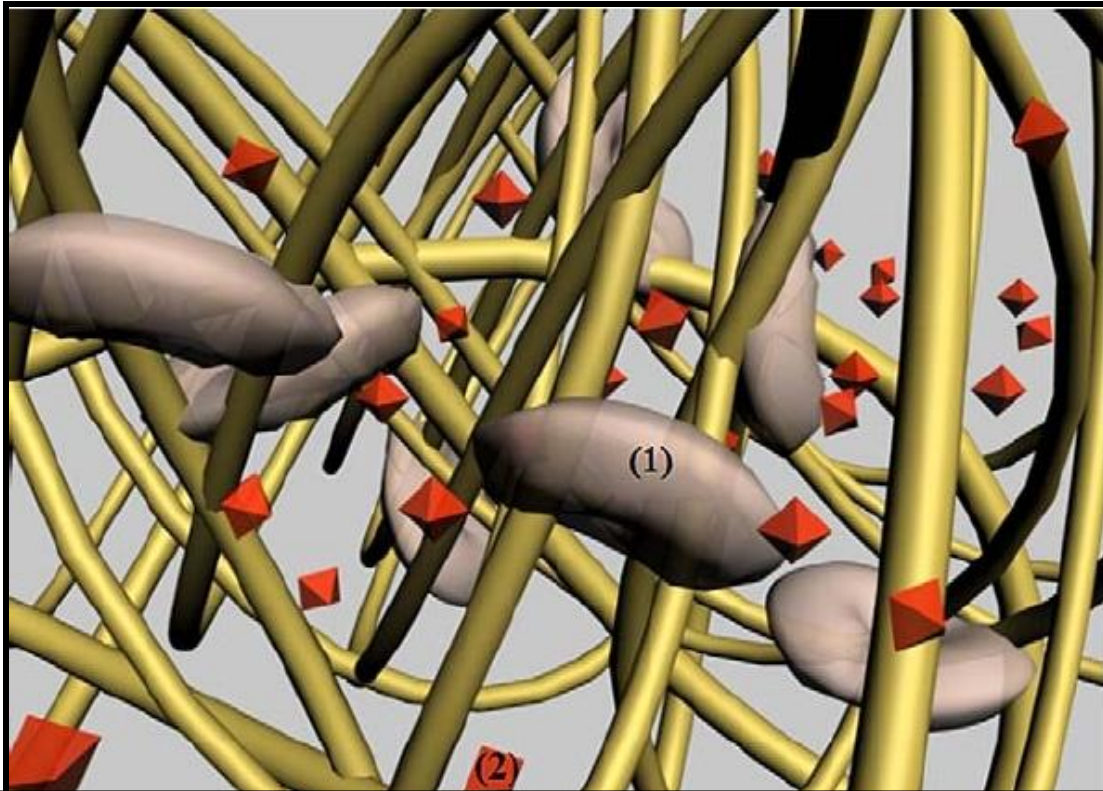


Fig. 8 (tomada de Dohan et al.): Modelo computarizado de la trama de fibrina formada en el cPRP, plaquetas atrapadas en la trama (1) y moléculas de citoquinas extrínsecas a la trama (2)

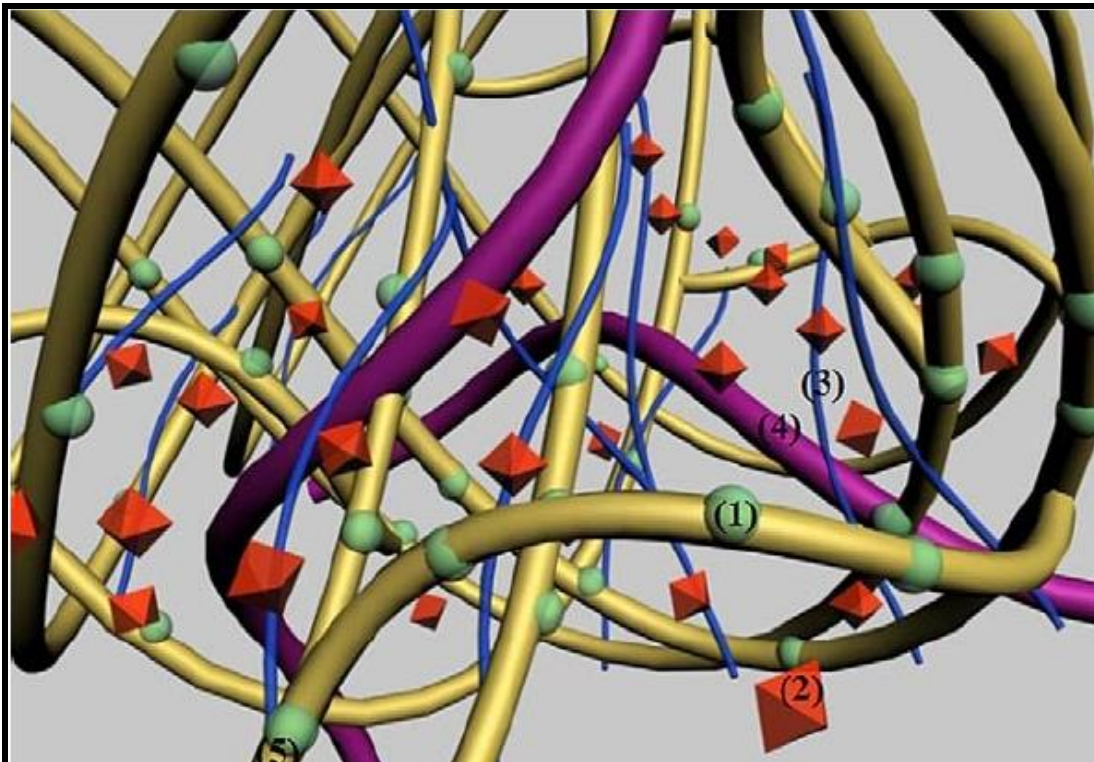


Fig. 9 (tomada de Dohan et al.): modelo computarizado de la trama de fibrina lograda con la técnica de PRF, interactuando con moléculas de fibronectina (4) y GAG (3), factores de crecimiento atrapados intrínsecamente en las fibras (1) y otras de manera extrínseca (2)



Fig. 10 (Tomada de Dohan et al.): coagulo de PRF extendido en forma de membrana.

OTROS CONCENTRADOS PLAQUETARIOS

(3), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

Desde mediados del siglo pasado, se utilizan concentrados plaquetarios para fines transfusionales en casos de depleción medular y patologías que afectan la producción de plaquetas en general. Paralelamente desde los años sesenta, se trabaja en la investigación de la fibrina como adhesivo biológico. Es posible rastrear el estudio de las citoquinas plaquetarias y sus funciones relacionadas con la reparación ósea a principios de los años ochenta. Desde principios de los noventa se presentan publicaciones relacionadas con la aplicación de concentrados plaquetarios al fin que estudiamos. Recibiendo desde ese momento el nombre de PRP, aun cuando las técnicas para su manipulación se hayan depurado, aun tras el surgimiento de aparatología específica para este fin que simplifican notablemente los pasos y disminuye los volúmenes de sangre a utilizar. Pero desde comienzos de la década actual, empezaron a surgir concentrados con distintas denominaciones, tales como **PRG** (*Platelet rich gel*), **PRGF** (*Platelet rich grown factors*), **PRF** (*Platelet rich fibrin*). A excepción de éste último, que ya hemos analizado, muchos autores encuentran que, dado que su estructura, composición y técnica para su obtención, no difieren en gran medida, no justifican una denominación distinta y no hacen más que crear confusión, buscando resaltar las mínimas diferencias con una denominación distinta. De hecho, ante una revisión bibliográfica, ninguno de estos presenta varias líneas paralelas de investigación como para justificar su consideración separada de los dos tipos de concentrados ya analizados (**cPRP** y **PRF**), si bien el protocolo del **PRGF** posibilita la manipulación de volúmenes mucho menores de sangre para lechos más reducidos.

PROTEINA MORFOGENETICA DEL HUESO (BMP)

(1), (2), (3), (4), (13), (14), (15), (16), (18).

Las **BMP**, como dijimos, pertenecen a la familia de los **TGF- β** . Fueron descubiertas por Urist en 1965, quien encontró que “la propiedad regeneradora del hueso, reside en el hueso mismo”, describiendo la propiedad osteoinductora de un extracto de hueso desmineralizado, implantado en el músculo de un roedor, fue él quien la denominó **BMP**. Gracias a la tecnología del DNA recombinante, es que más tarde se logro identificar su estructura y los genes que la codifican, a finales de los 80`s, caracterizando 4 de las 15 BMPs actualmente conocidas (BMP 1 a la 4).

Sobrevino luego el descubrimiento (durante el transcurso de los 90s), de que esta familia de proteínas interviene no solamente en procesos regenerativos, sino que tiene un rango de acciones inductoras mucho más amplio sobre diversos tejidos embrionarios. En efecto, en el embrión, a una alta concentración, inducen la diferenciación de la epidermis, niveles intermedios promueven la formación de las crestas neurales y concentraciones reducidas inducen la diferenciación de la placa neural.

Descubiertos estos fenómenos, se hizo evidente que en realidad, las BMP, tienen un abanico muy amplio de funciones, dependiendo estas de su concentración y de su ubicación espacial y temporal en el organismo y en el tejido blanco en particular. Por lo que su nombre, en realidad, tiene más que ver con el contexto en el que fueron descubiertas, más que con una acción restringida al hueso como tejido.

De acuerdo a su estructura química, las BMP han sido reagrupadas de la siguiente manera: las BMP 2 y 4, pertenecen a una subfamilia; las 5, 6, 7 y 8 a otra; una tercer subfamilia está integrada por las 3 y 10; mientras que las restantes se mantienen individualmente; la BMP 1, a pesar de su estructura y nombre, se excluye de esta familia, ya que de hecho, es una enzima de tipo proteasa, que interviene en la síntesis del colágeno.

A grandes rasgos, las que poseen alguna capacidad osteoinductora, son las BMP 2, 3, 4, 6 y 7; siendo las mas confiables a este fin las 2 y 7; las restantes, además de no poseer propiedades osteogénicas, están involucradas en los procesos condrogénicos e inhibición de la miogénesis.

Antagonismos de las BMPs

Si bien existen antagonistas específicos para algunas BMP, como es el caso de una molécula llamada “Noggin” y otra denominada “Chordin” para la BMP 4, a la cual se unen y le impide interactuar con su receptor. En animales inferiores como drosophila o el anfibio xenopus, se ha descubierto una molécula que desempeña una importante función de liberar a la BMP 4 de esta interacción con “Chordin”, esto viene a colación ya que, si bien en estos animales se las identificó como “Tolloid” y “xolloid” respectivamente, una proteína homóloga por su estructura en el humano, es ni más ni menos que la BMP1. Esto dejaría abierta la posibilidad de una hipotética acción reguladora sobre otras BMP por parte de la misma.

Se sabe que la BMP 3 tiene actividad osteoinductora, pero ante la BMP 2 se ha visto una actividad de antagonismo por parte de la primera sobre la segunda.

Papel de las BMPs en el desarrollo embrionario

Esqueleto axial y apendicular:

El papel de la BMP 5 en la condrogénesis está comprobado. En el desarrollo de las estructuras óseas del esqueleto axial y apendicular, se verifica esta función por su alta concentración en el lugar de desarrollo de las estructura cartilagosas, que luego, por osificación endocondral, darán lugar a estructuras óseas en esta parte de nuestro esqueleto. Ya formado el cartílago de estas regiones, las BMP 2, 4 y 7, se identifican en el mesénquima que lo rodea. A medida que el reemplazo del cartílago por hueso, la ubicación de estas se va restringiendo al tejido condensado en torno al cartílago (pericondrio) y persiste en el periostio, lo que permite la existencia de células osteoprogadoras en esta zona, necesarias para el crecimiento y la reparación de los huesos.

La BMP 6 tiene una función distinta a las otras, ya que es observable solo en las zonas donde los condrocitos sufren hipertrofia para luego morir y dejar cavidades vacías que serán invadidas por células sanguíneas y osteoblásticas, es decir que inicia el proceso de apoptosis (muerte celular programada) en los condrocitos.

Las BMP en general, están relacionadas con el proceso apoptótico que ocurre a nivel interdigital en la separación de los dedos durante el desarrollo embrionario.

Desarrollo de los elementos craneofaciales:

Las células osteoprogenitoras (células mesenquimáticas), de esta región, derivan de las crestas neurales, mientras que las del esqueleto axial son de origen somítico (mesodermo paraaxial) y el apendicular del mesodermo lateral. Por otro lado la mayor parte del cráneo y cara presentan osificación intramembranosa, en donde es un tejido conectivo el que se transforma en hueso sin intervenir en lo absoluto tejido cartilaginoso. A pesar de esto las BMPs involucradas en el desarrollo de esta región del esqueleto, son las mismas nombradas en las anteriores, las BMPs 2, 4, 5 y 7.

Es interesante mencionar que las BMPs 2, 3, 4, 5 y 7 se asocian también con la odontogénesis. Una compleja interacción entre las BMP 4 y 8, es la responsable de la diferenciación entre molares e incisivos al polarizar el epitelio del estomodeo (futura cavidad bucal). La BMP 4 es un actor importante en la inducción recíproca que ocurre entre el órgano del esmalte y la papila dental, para la diferenciación de células generadoras de esmalte (ameloblastos) y de dentina (odontoblastos) respectivamente, en un último estadio de diferenciación de estos dos tipos celulares, también interviene la BMP 2.

Estudio sobre distintas líneas celulares in Vitro relacionadas con las BMPs

Lo que surge a primera vista del análisis de los distintos estudios realizados sobre cultivos celulares, es que son notables las diferencias de resultados obtenidos en todos ellos, esto se debe claramente a la diversidad de líneas celulares utilizadas y a las distintas concentraciones de BMP usadas. Todo esto conduce a la imposibilidad de tipificar una acción absoluta generalizada para las distintas BMP. Por ejemplo, no será igual el resultado obtenido aún a igual concentración de una determinada BMP, si las células utilizadas son obtenidas de médula ósea, de periostio o de periodonto.

Además, trasladado a situaciones in vivo, se hace todavía más compleja la definición de su acción por complejas interacciones no controladas por el operador, como ocurre in Vitro.

El linaje celular de los osteoblastos y osteoclastos se observa en la figura 11

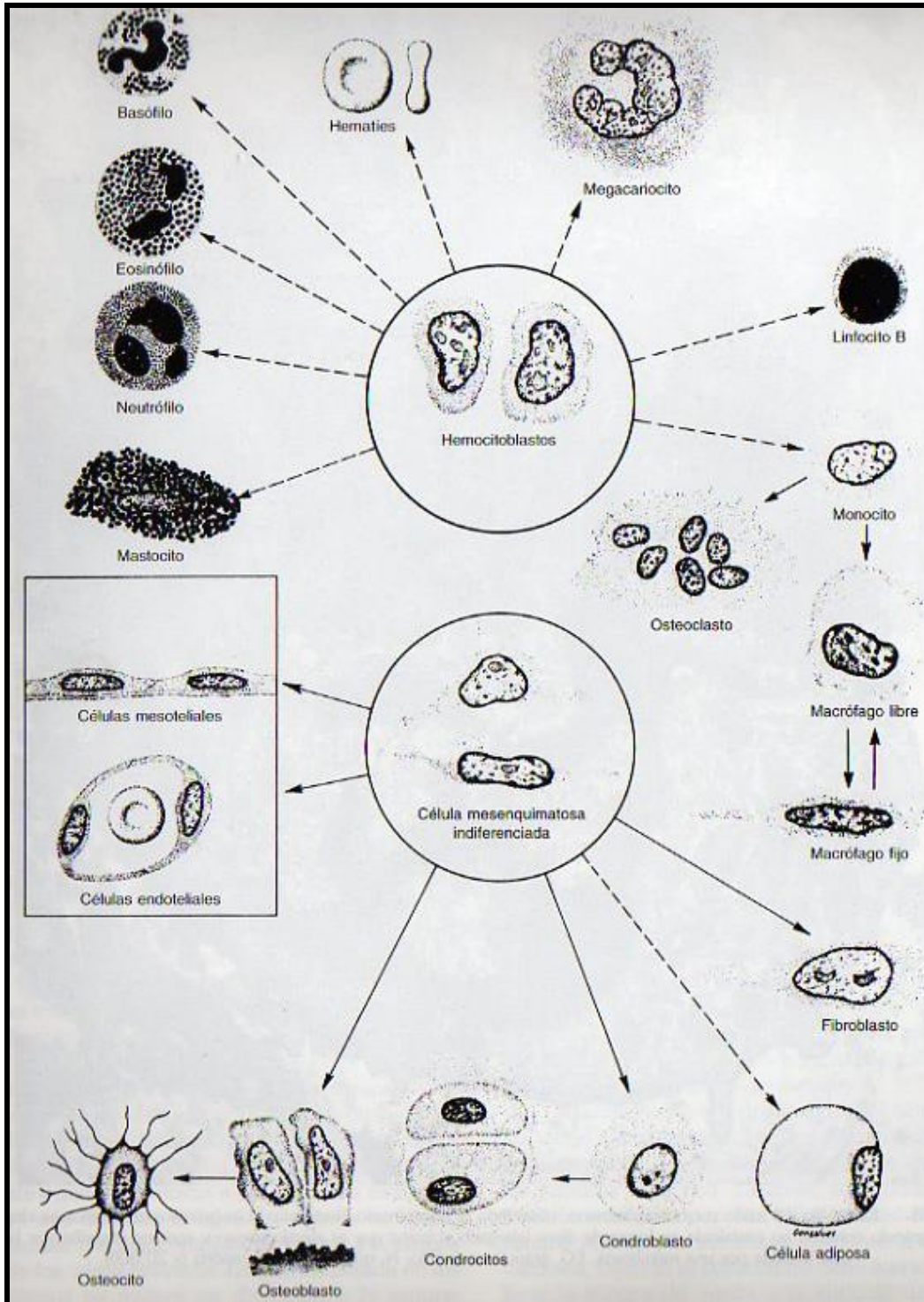


Fig. 11 (Tomada de Junqueira y col. 5º edición): esquema del linaje celular del osteoblasto y del osteoclasto.

Es necesario conocer esta relación de ancestralidad con otras células por parte del osteoblasto, por ejemplo con los condroblastos, adipositos y mioblastos (que no figuran en este esquema); dado que en particular la célula adiposa es una alternativa de maduración de células mesenquimáticas cuando se las somete a la acción de las BMP. Resultados obtenidos in Vitro, sugieren que dependiendo del tipo de receptor sobre el que actúen las BMP será la posible célula resultante en su papel inductor. Existen dos tipos de receptores para BMP: a los cuales se les llamo BMPR-1A y BMPR-1B. Entonces se sugiere que el primero es el responsable de la diferenciación en adipocitos, mientras que el segundo estaría involucrado en la diferenciación hacia osteoblastos. En efecto, a nivel medular óseo, existe una relación inversa entre osteogénesis y adipogénesis, en la osteoporosis se comprueba esto, en donde la adipogénesis en médula ósea es notable. Si bien en roedores se ha comprobado el viraje de mioblastos a células con fenotipo osteogénico, en humanos se verifica un potencial mucho menor en este sentido.

Los estudios conducidos a discriminar cuales de las BMPs muestran mayor potencial osteogénico sobre distintas líneas celulares, llevan a concluir por el momento que las que más actividad inductora en este sentido presentan, son las 2, 4 y 7, si bien la BMP 6 tendría la capacidad de acelerar la osificación endocondral.

Nuevas formas de BMP han sido estudiadas, las de tipo heterodiméricas de las formas más conocidas, han mostrado un potencial 20 veces superior respecto de sus formas homodiméricas respectivamente de las BMP 2, 6 y 7, en su potencial osteogénico.

Estudios in vivo relacionados con la actividad osteogénica de las BMPs

Las BMPs 2, 4, 5 y 7 están entre las proteínas mejor estudiadas y caracterizadas en lo que respecta a la osteoinducción. En efecto, la neoformación ósea es observable un mes después del trasplante por un proceso endocondral.

Inicialmente, la mayoría de los trabajos se conducían por el estudio sobre animales de la generación ectópica de tejido óseo. Mientras que la evaluación del potencial campo clínico de aplicación de las BMPs, también sobre animales, buscaba posibilitar la cicatrización óptima de defectos óseos críticos (en donde sin inducción

externa era imposible). A este respecto un primer modelo clínico fue un gran defecto segmentado de mandíbula de perro, tratado con BMP 2, demostrando con éxito su capacidad osteoinductora.

En los distintos estudios, fue observado que la cicatrización ósea lograda con el uso de BMP, era mejor, verificando esto con exámenes radiográficos, biomecánicos e histológicos, comprobando que el tejido resultante era compatible con el hueso nativo circundante y superior que el logrado con injertos de hueso autógeno. En lo que todos los autores coinciden, es que la naturaleza del carrier para su injerto, es decisiva para su éxito.

Es interesante mencionar además que en el perro, se ha demostrado la capacidad de las BMP 2 y 4 de generar dentina luego de la pulpotomía. Mientras que la BMP 2 se mostró en capacidad de favorecer la regeneración de las estructuras periodontales de inserción (hueso, cemento y ligamento periodontal).

BMP y cicatrización de fracturas:

El desarrollo esquelético embrionario y la regeneración ósea después de un trauma, son dos procesos muy similares, por lo tanto es lógico asumir que las BMP están también involucradas en la cicatrización normal de las fracturas.

Estudios inmunohistoquímicos han destacado la presencia de las BMP 2 y 4 en las zonas fracturadas experimentalmente en ratas de laboratorio. En donde existían células mesenquimáticas indiferenciadas y preosteoblastos, esa alta concentración era más evidente. En la medida en que la cicatrización normal de la fractura avanzaba, esas concentraciones disminuían paralelamente. Es razonable pensar también que este proceso sea desencadenado inicialmente por la liberación de las propias BMP inmersas en la matriz ósea fracturada.

Estudios preliminares sobre pacientes humanos, con fracturas de difícil cicatrización se han realizado con la aplicación tópica de BMP 2, cuya reparación mostró una notable mejoría.

Estudios sobre la interacción de las BMP con otras sustancias

Al margen de los antagonismos mencionados previamente, se ha descubierto la interacción con numerosas sustancias. Se ha encontrado un efecto sinérgico en su accionar, entre la BMP 2 y la interleuquina-1 β , al igual que el descubierto entre la BMP 7 y el factor de crecimiento similar insulina 1 (IGF – 1). También se ha estudiado un aumento en la producción de BMPs en general por acción de estrógenos, sobre todo de la BMP 6.

Medicamentos como la simvastatina y la lovastatina (utilizados para disminuir los niveles de colesterol en sangre), han mostrado capacidad de activar al gen que codifica la BMP 2, esto último confirmado en estudios in vivo.

Un estudio sobre pacientes tratados con fenitoina, del fluido crevicular en presencia de hipertrofia gingival, demostró que en estos fluidos se encontraba un alto contenido de factores de crecimiento, tanto los de origen plaquetario como las de la familia de las BMPs.

Posibles efectos no deseados de las BMPs

Estudios sobre la participación de las BMPs en la calcificación vascular están siendo conducidos, aunque muy poco se ha avanzado hasta el momento. Las evidencias preliminares indicarían que la BMP 2 promueve la calcificación de las células musculares lisas vasculares, siendo inhibida en esta función por la proteína “Gla” de la matriz, por lo que en patologías que involucran la ausencia de esta última, la calcificación vascular sería generalizada por acción de dicha BMP. También se ha demostrado la expresión de BMP 4 y 7 en sitios que presentan calcificación de las células musculares arriba mencionadas. Como se indicó, los estudios a este respecto están en sus comienzos y queda mucho por analizar antes de concluir un efecto decididamente relacionado a esto.

Otros estudios sobre tumores hipofisarios de células secretoras de prolactina, indican la evidencia de una acción estimuladora del crecimiento tumoral por parte de la BMP 4. Es posible en efecto, identificarla en sitios tumorales de este tipo y se demostró la inhibición del crecimiento del mismo por la administración local de Noggin, antagonista específico de la BMP 4 ya mencionado.

TERAPIA GENICA

(3), (4), (18)

La utilización terapéutica del ADN puede, al menos teóricamente, corregir enfermedades genéticas, lentificar el progreso de tumores, enfrentar infecciones virales y detener enfermedades neurodegenerativas, es decir, puede dirigirse tanto a enfermedades congénitas como a adquiridas. Es con este fin que se investiga este tipo de terapéutica desde los años 70, pero es desde años muy recientes que se comenzó a analizar su posible uso en la regeneración de tejidos.

Para lograr la introducción del segmento de ADN en la célula blanco, existen dos enfoques distintos, aún cuando ambos precisen de un vector o carrier capaz de vencer la barrera constituida por la membrana celular y según el fin buscado, también la membrana nuclear.

El primer paso consiste en, conocer a la perfección la estructura química de la proteína que se busca produzca la célula blanco (sea una enzima, una proteína estructural o una proteína de secreción). Conociendo esta, es posible hoy en día mediante técnicas de ADN recombinante, producir una molécula de ADN capaz de codificar esa sucesión de aminoácidos que constituye la proteína deseada, lo que por si mismo, constituye un gen y que es comúnmente denominado "plásmido", se hará un apartado para plantear una objeción a este término.

Plásmidos

Algunos autores denominan a estos segmentos de ADN como "plásmidos". Técnicamente, un plásmido es un segmento de ADN circular, de entre 1000 a 5000 pares de bases, utilizados por las bacterias (organismos procariontes), para intercambiar información que les dé un carácter fenotípico nuevo, como la resistencia a determinado antibiótico, es el caso del "Plásmido R", el cual es responsable de la resistencia de E. Coli a las penicilinas, o el plásmido T, que otorga resistencia a las tetraciclinas. La creación de plásmidos para su uso en terapia génica, es aplicable solo a técnicas que utilicen bacterias, como es el caso de la biosíntesis industrial de algunas proteínas humanas, por ejemplo la insulina humana o la BMP, las cuales por se similares a las humanas y siendo obtenidas por técnicas de ADN recombinante, son denominadas con el nombre de la proteína y el prefijo "Rh", que indica "recombinant human", entonces, a la BMP comercializada por algunos laboratorios se la conoce como R_h BMP. Un plásmido verdadero no es útil o

aplicable a células eucariota (poseedoras de núcleo verdadero como las humanas), ya que no se puede incorporar al núcleo por un lado, por otro lado aún cuando se utilizara un vector que lo logre, un plásmido, siendo bacteriano, utiliza codones de iniciación y de corte o stop distintos a los utilizados por las células humanas, además de que dentro de la sinonimia de codones que codifican a cada aminoácido, distintos organismos priorizan uno de ellos sobre otros, eso también es una diferencia entre ADN de plásmido bacteriano y el humano. Finalmente, como ya dijimos, un plásmido posee un tamaño limitado, en el mejor de los casos, 5000 pares de bases, si cada codón está formado por tres bases, se necesitan tres de ellas para codificar a cada aminoácido de la proteína final, lo que nos podría dar un máximo de 1600 Aminoácidos posibles, algo bastante limitado para el caso de proteínas de mediano a alto peso molecular. Por todo esto, no es correcto denominar “plásmido” a los segmentos de ADN a utilizar en terapia génica en el hombre.

Retomando la secuencia de pasos a seguir en la terapia génica, el siguiente paso es la introducción de ese gen en un vector apropiado para el caso, dependiendo de la duración del efecto que se necesite y de la extensión de la modificación que se pretende lograr.

En términos generales, los vectores utilizados para la terapia génica, son de dos tipos, liposomas (vesículas de membrana fosfolipídica similar a la membrana celular) o virus. En el último caso, se pueden utilizar dos tipos de virus: puede ser un retrovirus, que además de integrar el gen en el núcleo, lo hace directamente dentro de los cromosomas, esta capacidad por parte del retrovirus como vector hace que el efecto sea mucho más duradero; por otro lado, si lo que se busca es un efecto temporario, el virus a utilizar es un adenovirus, que por sus características, si bien envía el gen portado por él al interior del núcleo, no lo integra a cromosomas, por lo que su efecto será transitorio (este último es el enfoque adoptado por quienes investigan su aplicación a la regeneración ósea).

Otra distinción en el enfoque utilizado en la terapia génica es, según su metodología, in Vitro (Fig. 12) o en vivo (Fig. 13). En el segundo caso, se aplicará el vector tratado ya sea localmente, o por inoculación intravenosa o aerosol, las dos últimas vías de administración se usarán cuando el efecto buscado es de orden general, localmente se utilizará cuando el efecto buscado es a nivel de un tejido u órgano en particular, como es el caso de la regeneración ósea aquí analizada.

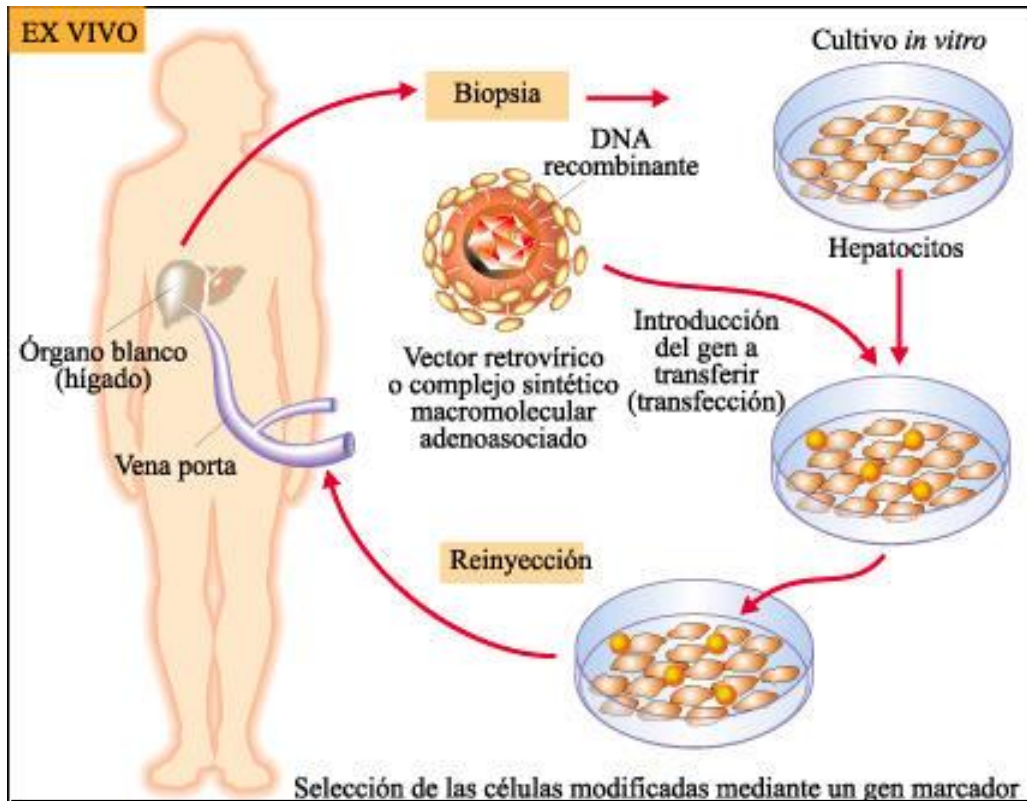


Figura 12 (Tomada de Curtis – Barnes, 6º Ed.): esquema de la terapia génica in Vitro.

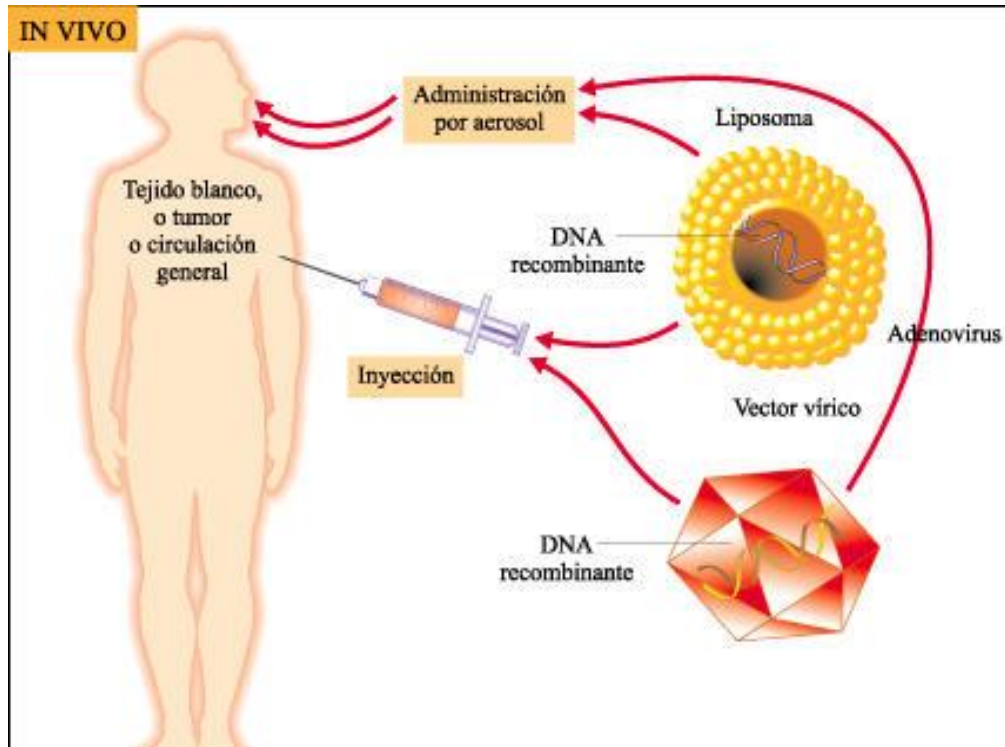


Figura 13 (Tomada de Curtis – Barnes, 6º Ed.): esquema de la terapia génica in Vivo en sus tres modalidades de administración.

Terapia génica aplicada a la regeneración ósea

Las perspectivas de la terapia génica aplicada a la regeneración ósea in vivo, son alentadoras, aún cuando su investigación está apenas en sus comienzos. Es de esperarse que resultados confiables sean observados en el largo plazo. El enfoque de aplicación de la metodología in Vitro, es superado en cuanto a sus resultados experimentales, por el desarrollo in Vitro de células osteogeneradoras utilizando cultivos de células mesenquimáticas tratadas con BMPs, dado que se obvia un paso, que es el de inducir a las células a generar sus propios factores de crecimiento (BMPs), en lugar de administrarle los mismos ya sintetizados, con esto se disminuyen las posibilidades de errores.

MANIPULACION IN VITRO Y CONDUCCION LOCAL DE CÉLULAS ESTAMINALES (Stem cells)

(3), (17), (19)

Las células estaminales mesenquimáticas, como ya se vio previamente, poseen la capacidad de diferenciarse, según el estímulo local, en muy variadas líneas celulares, entre estas, los osteoblastos, condroblastos, adipositos o miocitos. Por ello es razonable pensar que, a menor grado de diferenciación presenten las células utilizadas, mayor será la posibilidad de fracaso, en el sentido de que hay mayores posibilidades de que los factores estimuladores induzcan su diferenciación en una línea celular no deseada, como puede ser la adiposa o la condrogénica.

A este efecto sirve como ejemplo el trabajo publicado por Shi Jiang Zhu y col., quién utilizó tres líneas celulares de distinta procedencia y por ende con distinto grado de diferenciación: un primer grupo procedente de células mesenquimáticas de médula ósea, un segundo grupo aislado de chips de hueso alveolar y un tercer grupo obtenido de periostio. Los tres grupos fueron luego cultivados in Vitro y tratados con R_h BMP 2. Los resultados estadísticos e histológicos se observan en las figuras 14 a 17. Nótese la amplia formación de tejido adiposo junto al bajo porcentaje de tejido óseo obtenido con el uso de células procedentes de médula ósea. El vector utilizado para su injerto, fue en los tres casos, FG (fibrin glue), un coágulo de fibrina autólogo sin ningún agregado. La estabilidad de este carrier en el tiempo es limitada, por lo que el porcentaje de hueso formado puede haberse visto afectado por ello.

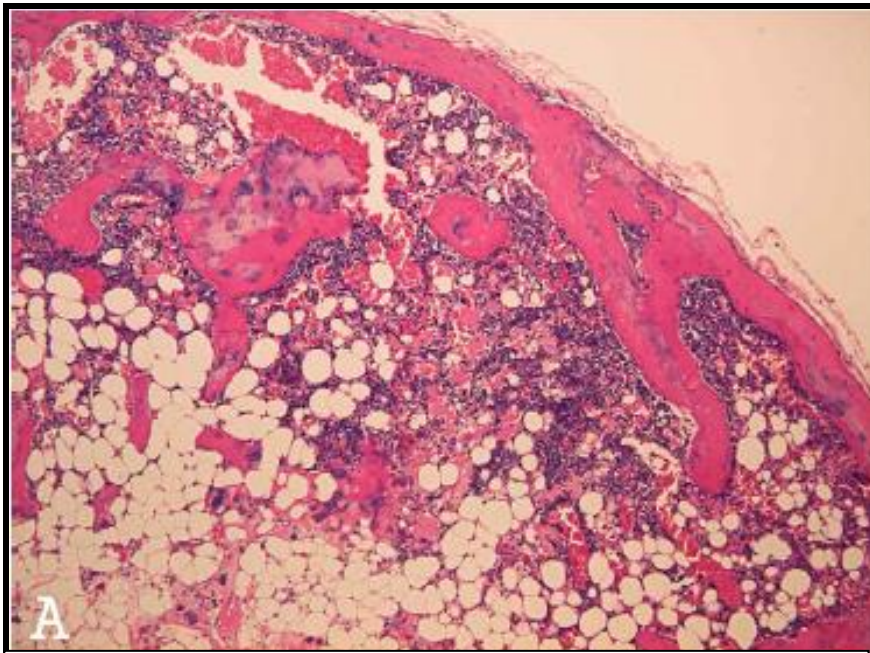


Figura 14 (tomada de Shi Jiang Zhu et al.): imagen histológica del sitio de implante de células mesenquimáticas de médula ósea. (H – E)

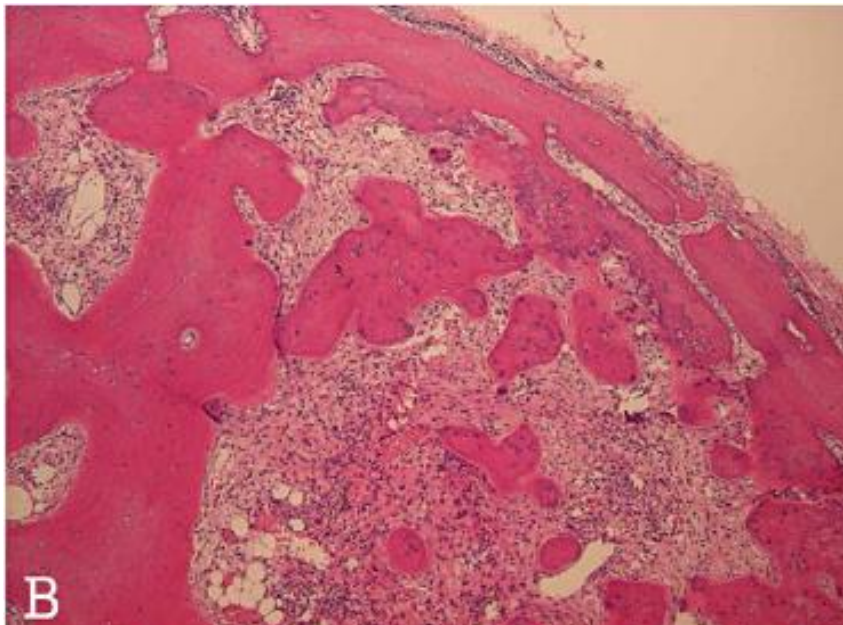


Figura 15 (tomada de Shi Jiang Zhu et al.): imagen histológica del sitio de implante de células de hueso alveolar (H – E)

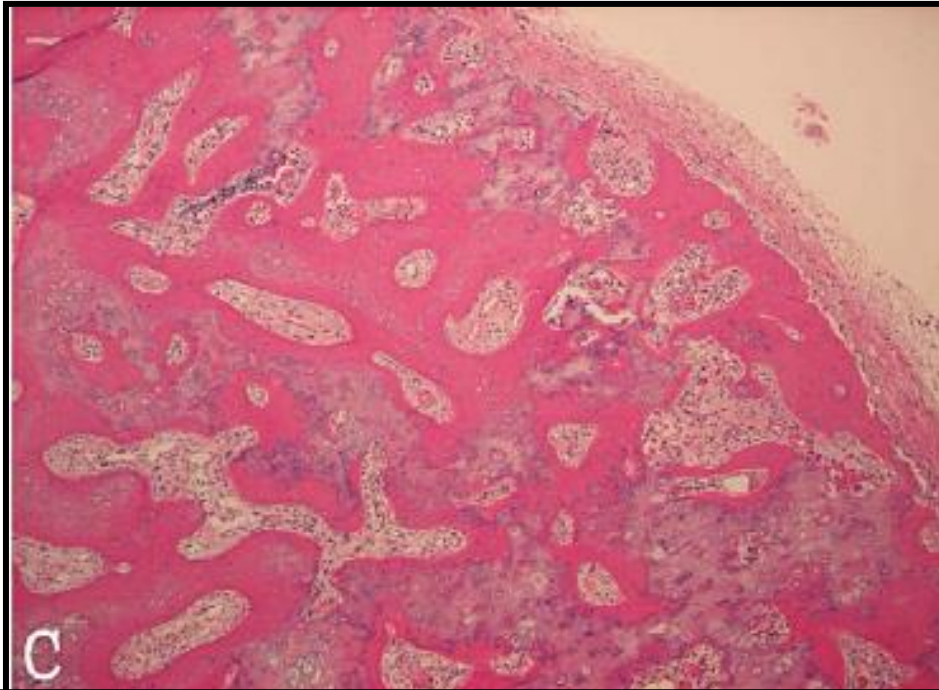


Figura 16 (tomada de Shi Jiang Zhu et al.): imagen histológica del sitio de implante de células de origen perióstico (H – E)

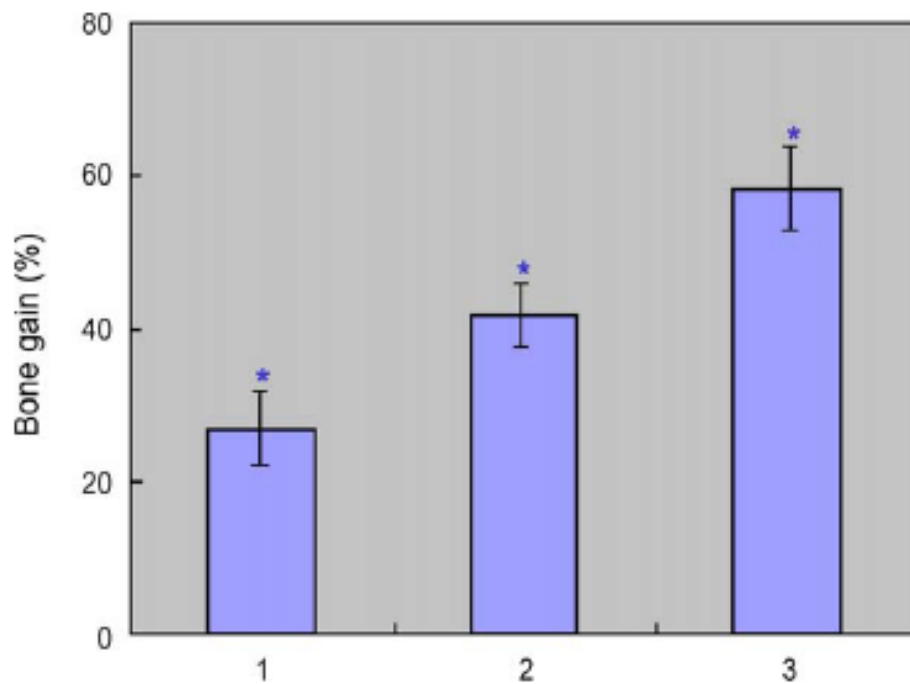


Figura 17 (tomada de Shi Jiang Zhu et al.): cuadro comparativo del porcentaje de tejido óseo formado en relación al tamaño del injerto. (1: stem cells, 2: células de hueso alveolar, 3: células de origen perióstico).

Una posible explicación al aparente fracaso con el uso de células procedentes de médula ósea, es que se haya hecho una incorrecta selección del linaje celular, células que ya están preinducidas para el linaje adiposo, seguramente habrán desarrollado receptores que ante la acción de la BMP, sigan esa línea de diferenciación. Esto es un buen ejemplo de los riesgos que implica, la selección de células menos diferenciadas para su cultivo y estimulación. Seguramente con el tiempo, surgirán métodos que permitan prevenir este riesgo, pero en la actualidad la alta posibilidad de esto, aconseja el uso de células con mayor grado de diferenciación hacia el linaje osteogenerador para este fin.

La experiencia de W. Pradel en la aplicación de células cultivadas de origen óseo, es algo más alentadora. El muestreo son pacientes tratados luego de la enucleación de quistes de diversos tamaños, un grupo con la técnica descrita y un segundo grupo con hueso autólogo de cresta iliaca, los controles postoperatorios no encuentran grandes diferencias radiográficas entre uno u otro grupo, pero en los controles luego del año, la calidad ósea observada en radiografías es notablemente superior en el grupo tratado con hueso autólogo. Aún cuando sus conclusiones indican un optimismo respecto al resultado obtenido con células cultivadas, es razonable pensar que si se pudieran realizar biopsias y observaciones histológicas de las mismas, no diferirían en mucho de las muestro del trabajo descrito anteriormente.

CONCLUSIONES:

Del análisis de las diversas posibilidades disponibles para la estimulación del crecimiento óseo en cirugía perimplantar, podemos concluir que algunas de ellas (uso de cultivos celulares o terapia génica), se encuentran en etapa experimental y aún cuando son promisorias respecto de su efectividad, están lejos de estar disponibles para el cirujano u operador en la práctica diaria.

Los concentrados plaquetarios, de uso corriente, costos accesibles y resultados predecibles, continúan evolucionando en cuanto a la técnica para su obtención y concentración. A este respecto, podemos destacar al **PRF** por su simpleza, elasticidad y estabilidad en el tiempo. El **PRGF**, si bien no justifica una denominación distinta al **cPRP**, posee un protocolo que permite la manipulación de volúmenes inferiores de sangre extraída. Como sea, la disponibilidad de factores de crecimiento

que estimulen la quimiotaxis y mitosis de células osteogeneradoras, además de la neoangiogénesis, de orden autólogo y a tan bajo costo, hacen de estos concentrados y su uso, una práctica de posible aplicación rutinaria en cirugía implantológica. Sus propiedades adhesivas que han demostrado colaborar notablemente con el cierre primario de la herida quirúrgica, además del estímulo que ejercen sobre la reepitelización de la misma, son un “bonus” nada despreciable a la hora de considerar su uso sistemático. Su única desventaja es la relativa corta estabilidad temporal con lo cual no mantienen por sí solos el espacio físico que ocupan inicialmente. Esto aplicado a la regeneración ósea, es un problema, pero si se los combina con hueso autólogo en partículas, reúne las características de un muy buen carrier y se aprovechan las propiedades osteoinductoras del hueso autólogo que los concentrados no poseen.

Por último, el análisis meticuloso de las **BMP** y sus propiedades, demuestran el largo protocolo experimental que hace falta antes de poder disponer de estos aditivos quirúrgicos. Si bien ya hay laboratorios que ofrecen la Rh **BMP 2** y Rh **BMP 7**, a la venta, sus costos y la falta de importación a nuestro país, hacen que todavía no estén disponibles para su uso en nuestro medio. Por otro lado la diversidad de resultados obtenidos por distintos grupos, desaconsejan su uso inmediato.

Tal vez en un futuro no muy lejano, ¿podamos asistir a la combinación de Rh **BMP** con cultivos celulares, utilizando como carrier algún concentrado plaquetario de estabilidad mejorada?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Histología Básica, Junqueira y Carneiro, 5º Edición, 2000, Editorial Masson
- (2) Embriología Médica de Langman, T.W. Sadler, 7º Edición, 1996, Editorial Panamericana.
- (3) Rehabilitación implantosoportada en casos complejos, M. Chiapasco y E. Romeo, 1º Edición, 2006, Editorial Amolca.
- (4) Biología, Curtis y Barnes, 6º Edición, 2001, Editorial Panamericana
- (5) Platelet rich plasma, Robert E. Marx et al., OOOOE, 1998; 85: 638 – 46.
- (6) Platelet rich fibrin, a second generation platelet concentrate, Part 1, David E. Dohan et al., OOOOE, 2006; 101: E37 – 44.
- (7) Platelet rich fibrin, a second generation platelet concentrate, Part 2, David E. Dohan et al., OOOOE, 2006; 101: E45 – 50.
- (8) Platelet rich fibrin, a second generation platelet concentrate, Part 3, David E. Dohan et al., OOOOE, 2006; 101: E51 – 55.
- (9) Platelet rich fibrin, a second generation platelet concentrate, Part 4, David E. Dohan et al., OOOOE, 2006; 101: E56 – 60.
- (10) Platelet rich fibrin, a second generation platelet concentrate, Part 5, David E. Dohan et al., OOOOE, 2006; 101: 299 – 303.
- (11) PRP, cPRP, PRF, PRG, PRGF, FC... How to find your way in the jungle of the platelet concentrates?, Agatha Cieślik - Bielecka et al., OOOOE, 2006; 08: 034.
- (12) Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing, E. Soffer et al., OOOOE, 2003; 95: 521 – 528.
- (13) The use of R_h BMP in the osseous restoration of cleft palate without the use of bone grafting, P.J. Boyne et al., OOOOE, 2006;46
- (14) Nuevos mecanismos involucrados en la patogénesis de adenomas hipofisarios, D. Giacomini et al., MEDICINA (Bs. As.), 2003;63: 147 – 150.
- (15) Expression of growth factors in the gingival crevice fluid of patients with phenytoin – induced gingival enlargement, Archives of oral biology, 2004;49: 945 – 950.

- (16) Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Calcification, Hruska KA, Mathew S y Saab G, Circulation Research, 2005, 97(2):105-114.
- (17) Bone regeneration after enucleation of mandibular cyst: comparing autogenous graft from tissue engineered bone and iliac bone, Winnie Pradel et al., OOOOE, 2006; 101: 285 – 290.
- (18) Terapia génica ex vivo para producir hueso usando diferentes tipos celulares, D. Musgrave et al.; Laboratorio para crecimiento y desarrollo Departamento de cirugía ortopédica y genética molecular y bioquímica, Universidad de Pittsburg.
- (19) A comparative qualitative histological analysis of tissue engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells and periosteal cells, Shi Jiang Zhu et al., OOOOE, 2006;101: 164 – 169.