

Generación de un sustituto de mucosa oral humana y comprobación de su viabilidad mediante ingeniería tisular

C. Marañés Gálvez¹, E. Licerías Licerías¹, M. Alaminos², R. Fernández Valadés¹, A.M. Ruiz Montes¹, I. Garzón², M.C. Sánchez-Quevedo², A. Campos²

¹Servicio de Cirugía Pediátrica. HUVN Granada. ²Departamento de Histología. Facultad de Medicina. Granada

RESUMEN

La reconstrucción de grandes defectos de mucosa oral a menudo es desafiante, por la escasez de mucosa oral sana para reemplazar tejidos dañados. De esta forma, las técnicas de ingeniería tisular pueden suponer una fuente de tejidos autólogos disponible para trasplantar a estos pacientes. En este trabajo hemos desarrollado un nuevo modelo de mucosa oral artificial generada mediante ingeniería tisular usando un soporte de fibrina-agarosa. Para ello, se han generado cultivos primarios de fibroblastos de la mucosa oral humana y queratinocitos a partir de pequeñas biopsias de mucosa oral normal y aplicándoles tratamientos enzimáticos. Después, se ha determinado la viabilidad de las células cultivadas mediante microanálisis por rayos-X, demostrando que la mayoría de las células de los cultivos primarios estaban vivas y tenían elevados K/Na ratios. Una vez que la viabilidad celular fue determinada, se usaron los fibroblastos y queratinocitos cultivados para desarrollar un constructo de mucosa oral sobre una matriz extracelular de fibrina-agarosa y técnicas secuenciales de cultivos sobre soportes microperforados. El análisis histológico de estos tejidos obtenidos mostró grandes similitudes con los controles de mucosa oral normal. El epitelio de los sustitutos de mucosa oral tenía varias capas, con desmosomas y microvellosidades apicales y micropliegues. Tanto los controles como los sustitutos de mucosa oral mostraban gran expresión suprabasal de citoqueratina 13 y baja expresión de citoqueratina 10. Todos estos resultados sugieren que nuestro modelo de mucosa oral utilizando fibrina-agarosa como matriz muestra características muy similares a la mucosa oral humana nativa.

PALABRAS CLAVE: Fibrina-agarosa; Reconstrucción Ingeniería tisular.

GENERATION OF A SUBSTITUTE FOR HUMAN ORAL MUCOSA AND VERIFICATION OF ITS VIABILITY BY TISSUE-ENGINEERING

ABSTRACT

Reconstruction of large oral mucosa defects is often challenging, since the shortage of healthy oral mucosa to replace the excised tissues. This way, tissue engineering techniques may provide a source of autologous tissues available for transplant in these patients. In this work, we

have developed a new model for artificial oral mucosa generated by tissue engineering using a fibrin-agarose scaffold. For that purpose, we have generated primary cultures of human oral mucosa fibroblasts and keratinocytes from small biopsies of normal mucosa oral using enzymatic treatments. Then, we have determined the viability of cultured cells by electron probe quantitative X-ray microanalysis, and we have demonstrated that most of the cells in the primary cultures were alive and had high K/Na ratios. Once cell viability was determined, we used cultured fibroblasts and keratinocytes to develop an artificial oral mucosa construct by using a fibrin-agarose extracellular matrix and a sequential culture technique using porous culture inserts. Histological analysis of the artificial tissues showed high similarities with normal oral mucosa controls. The epithelium of the oral substitutes had several layers, with desmosomes and apical microvilli and micropliegues. Both the controls and oral mucosa substitutes showed high suprabasal expression of cytokeratin 13 and low expression of cytokeratin 10. All these results suggest that our model of oral mucosa using fibrin-agarose scaffolds show several similarities with native human oral mucosa.

KEY WORDS: Fibrin-agarose; Constructs; Tissue engineering.

INTRODUCCIÓN

Diferentes procedimientos quirúrgicos se han llevado a cabo en la región orofaríngea para la corrección de grandes defectos de tejido⁽¹⁾. La corrección de estos defectos supone un gran desafío, y los cirujanos orales y maxilofaciales se ven a menudo enfrentados con escasa disponibilidad de tejido para reemplazar dichos defectos⁽²⁾. Aunque se ha demostrado que la reconstrucción primaria de grandes defectos es siempre más ventajosa que las reconstrucciones secundarias, el cierre primario de grandes defectos suele ser muy dificultoso. En estos casos, varios tipos de injertos de piel han sido propuestos como sustitutos autólogos de mucosa oral⁽³⁾. En algunos pacientes, sin embargo, el uso de estos injertos se ha asociado a complicaciones, tal como la presencia de estructuras anexiales que causan crecimiento de vello en el injerto o excesiva queratinización en el tejido reconstruido⁽⁴⁾. Estas desventajas en ocasiones dan lugar a elevada morbilidad, junto con

Correspondencia: C. Marañés Gálvez. Servicio de Cirugía Pediátrica. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Av. de las Fuerzas Armadas, 2. 18014 Granada
E-mail: carolinamaranes@hotmail.com

Recibido: Diciembre 2006

Aceptado: Enero 2011

alteraciones estéticas y funcionales en los pacientes que se someten a estas técnicas.

La construcción de sustitutos biológicos de mucosa oral humana mediante ingeniería tisular podría contribuir a resolver estos problemas y complicaciones. Mediante el uso de estas técnicas, es posible desarrollar sustitutos eficientes de distintos órganos y tejidos con finalidad terapéutica. En este sentido, algunos investigadores han propuesto recientemente diferentes técnicas de cultivo para la construcción de un sustituto organotípico de mucosa oral^(1,2,5). La evaluación de la viabilidad de las células mantenidas en cultivo es muy importante antes de que sean usadas con fines clínicos y especialmente para la construcción de órganos y tejidos. Además, la construcción de órganos y tejidos depende de la disponibilidad de un sustrato biocompatible que permita a las células anclarse y crecer, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Evaluar la viabilidad de las células cultivadas no es fácil, habiéndose propuesto diferentes vías. Un porcentaje de métodos están basados en la detección de alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular como el azul tripán o el marcaje con yoduro de propidio⁽⁶⁾, o cuantificación de enzimas intracelulares en el medio de cultivo⁽⁷⁾. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas no son lo suficientemente sensibles como para detectar un daño celular precoz. En la mayoría de los casos, un resultado positivo con estas técnicas revela que la integridad de la membrana celular se ha perdido.

Por el contrario, una de las técnicas más sensibles para la determinación de la viabilidad celular es la cuantificación del contenido iónico de las células cultivadas, especialmente el potasio y el sodio⁽⁸⁻¹⁰⁾. El microanálisis histoquímico con rayos X asociado a microscopía electrónica es la forma más eficiente de medir la composición elemental total, haciendo posible determinar las concentraciones de diferentes elementos y la ultraestructura de la célula⁽¹¹⁾. Usando esta técnica bioquímica y morfológica combinada, hemos cuantificado previamente el contenido iónico de diferentes tipos celulares, incluyendo células U937⁽⁸⁾, células de tumores epiteliales⁽¹²⁾ y células K562⁽¹³⁾. Sin embargo, el modelo de microanálisis de queratinocitos y fibroblastos orales humanos cultivados mediante ingeniería tisular no ha sido determinado aún.

Por otro lado, diferentes biomateriales han sido usados como sustituto estromal. En teoría, un buen biomaterial debería ser compatible y consistente, y las células epiteliales deberían ser capaces de adherirse y crecer en él. En general, los biomateriales que se han usado con más frecuencia para construir sustitutos de tejido epitelial-estromal han sido de colágeno tipo I y fibrina. El colágeno tipo I se ha usado como soporte en ingeniería tisular para la construcción de piel, mucosa oral, córneas entre otros tejidos^(14,15). Sin embargo, el colágeno es un material caro que tiende a perder volumen cuando las células están ancladas en él⁽¹⁶⁾. Además, los sustitutos estromales de colágeno no son estables y se degradan con rapidez⁽¹⁷⁾. Sin embargo, la fibrina humana se ha propuesto como sustituto estromal para construir diferentes tejidos, especialmente piel humana⁽¹⁸⁻²⁰⁾, y presenta otras ventajas, como

el bajo coste, disponibilidad y buena tolerancia por parte de las células. Los geles de fibrina, en contraste con los de colágeno, no pierden volumen cuando entran en contacto con las células⁽¹⁸⁻²⁰⁾, aunque su consistencia puede ser en ocasiones pobre. Otro material es la agarosa, que se usa habitualmente en ingeniería tisular del cartílago⁽²¹⁾, pero no se encuentran referencias de su uso combinado con otros materiales. Usando una mezcla de fibrina-agarosa hemos sido capaces de conseguir un sustituto eficiente de la córnea de conejo con buenos resultados en términos de consistencia, transparencia y crecimiento celular⁽²²⁾.

En este trabajo hemos desarrollado un nuevo modelo de mucosa oral artificial usando fibroblastos humanos y queratinocitos sobre una matriz de fibrina-agarosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recogida de muestras

Veinte pequeñas biopsias que corresponden a mucosa oral humana fueron tomadas de donantes sanos mediante cirugía menor con anestesia local. El tamaño medio de las muestras fue de 3x3x2 mm. Tras la extracción los tejidos se introdujeron en medio de transporte a 4°C (Medio de Dulbecco modificado por Eagle DMEM; 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B) y se procesó en las siguientes 24 h.

Todos los pacientes dieron su consentimiento para participar en el estudio. Trabajo aprobado por un comité local (número 01/04).

Cultivos primarios de fibroblastos orales y queratinocitos

Una vez en el laboratorio, todas las muestras fueron lavadas dos veces en solución fosfatada tamponada (PBS) e incubadas durante 12 h a 37°C en un medio DMEM con 2 mg/ml de colagenasa I del *Clostridium histolyticum*. Este tratamiento enzimático es capaz de liberar los fibroblastos. Una vez que las muestras son digeridas, y para obtener un cultivo primario de fibroblastos, se separaron los componentes del tejido conectivo, se centrifugaron y se expandieron en frascos de cultivo con medio DMEM suplementado con antibióticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B) y 10% de suero fetal bovino (FBS), usando condiciones de cultivo estándar. Después, el epitelio oral no digerido fue lavado en PBS, cortado en pequeñas piezas y cultivado con una capa de mitomicina C (10 mg/ml), células alimentadoras 3T3 (8-10x10³ cel/cm²)⁽²³⁾. El medio usado en este caso fue una mezcla 3:1 de DMEM y Ham's F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de antibióticos, 24 µg/ml de adenina, 0,4 mg/ml de hidrocortisona, 5 mg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 1,3 ng/ml de triyodotironina y 8 ng/ml de toxina colérica.

En todos los casos, las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. El medio se cambió cada

3 días y se realizaron subcultivos de las células cultivadas usando una solución de tripsina 0,5 g/l con EDTA 0,2 g/l a 3°C durante 10 min. Los queratinocitos y los fibroblastos usados para el tejido siempre fueron de los tres primeros subcultivos celulares.

Fabricación del sustituto estromal de fibrina-agarosa

La fibrina fue obtenida de plasma fresco congelado de donante humano. Para producir un gel de fibrina⁽¹⁸⁻²⁰⁾, a 21 ml de plasma humano se le añadieron 250.000 fibroblastos cultivados resuspendidos en 2 ml de DMEM con 10% de suero bovino fetal. Para prevenir la degradación del sustrato mediante fibrinólisis, la mezcla se suplementó con 200 µl de ácido tranexámico. Finalmente, 2 ml al 1% de CaCl₂ fueron añadidos a la solución para iniciar la reacción de precipitación de la fibrina. Al mismo tiempo, agarosa tipo VII fue fundida y disuelta en suero bovino fetal y añadida a la mezcla de fibrina a una concentración final de 0,1%, justo después de que el CaCl₂ fuera añadido. La mezcla se deja solidificar durante 2 h a 37°C.

Construcción de sustitutos de mucosa oral mediante ingeniería tisular

Los constructos de mucosa oral organotípicos fueron desarrollados usando una técnica de cultivo secuencial, como se describe a continuación. Para asegurar que el cultivo está sumergido en líquido y además ayudar a una adecuada diferenciación celular de los queratinocitos, usamos un medio aire-líquido⁽²⁴⁾. Para ello, los cultivos fueron realizados en recipientes Transwell que están dotados de una membrana porosa con tamaño de poro de 0,4 µm. Esto permite a los nutrientes atravesar la membrana y previene la migración celular a otros compartimentos.

Para construir la mucosa oral artificial, el sustituto estromal fue desarrollado directamente sobre la membrana porosa. 24 h después de que el sustituto de matriz estromal hubo solidificado, los queratinocitos orales fueron sembrados sobre el estroma (aproximadamente 1.000.000 de queratinocitos por cada 25 ml de constructo), y se cultivaron durante 10 días sumergidos en medio de cultivo para queratinocitos. Una vez que los queratinocitos confluyeron, la técnica aire-líquido se usó durante 21 días más.

Evaluación microscópica de la mucosa oral artificial

Las muestras usadas para el análisis con microscopía electrónica fueron fijadas en glutaraldehído cocadilato al 2,5% y postfijadas en tetróxido de osmio durante 90 min. Tras la fijación, las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de acetona (30-50-70-95 y 100%); alcanzado el punto óptimo de secado, se montaron sobre soportes de aluminio y fueron cubiertas con oro de acuerdo con los procedimientos de rutina⁽²⁵⁾, y examinados al microscopio electrónico de barrido. Para microscopía de transmisión, las muestras fueron fijadas y postfijadas exactamente igual, pero embebidas en resina de Supr y cortadas en secciones ultrafinas con

un ultramicrotomo. Para el análisis, las secciones fueron marcadas con acetato uranil acuoso y citrato plomado y examinadas al microscopio electrónico de transmisión.

Inmunohistoquímica

La expresión de citoqueratinas 10 y 13 fue determinada por inmunohistoquímica en secciones fijadas en parafina que correspondían a controles y constructos de mucosa oral usando antígenos de ratón monoclonales contra citoqueratina 10 y 13. Primero, la parafina fue retirada de las muestras usando xilano, y las muestras fueron después rehidratadas en agua. Para desactivar las peroxidasas endógenas que pudieran afectar a los resultados de la hibridación, todas las muestras se incubaron en H₂O₂ al 3% durante 15 min. Después, se usó citrato a 0,01 M (pH 6,0) a 98°C durante 5 min para la recuperación de los antígenos.

Tras bloquear cualquier sitio de unión inespecífico con albúmina de suero bovino, se incubaron las muestras con anticuerpos durante 1 h a temperatura ambiente. Después de tres pases en suero bovino fetal al 0,5%, el anticuerpo secundario tipo IgG contra la superficie de ratón biotin-conjugado fue aplicado durante 30 min; además, una solución de estreptavidina de caballo peroxidasa-conjugada se aplicó durante 40 min. Finalmente, el color se dio con un kit comercial y las muestras fueron marcadas con hematoxilina de Mayer y montadas para evaluación con microscopía óptica. Como controles positivos se usaron muestras de mucosa oral humana normal. Como controles negativos se usó suero normal de caballo en vez de los anticuerpos primarios.

RESULTADOS

Los fibroblastos de mucosa oral humana fueron cultivados de forma eficiente usando técnicas de tratamiento enzimático ya descritas. Los fibroblastos orales aislados en el frasco de cultivo mostraron un buen crecimiento y alcanzaron confluencia alrededor del octavo día de cultivo ($8,32 \pm 3,23$ días). En cultivo, los fibroblastos orales adoptaron forma de huso, y la forma se hacía muy elongada cuando tendían a la confluencia.

Inicialmente, los queratinocitos se mantuvieron en el fondo del frasco de cultivo, formando pequeños agregados de 4-5 células rodeados de células alimentadoras, alrededor del octavo día ($8,2 \pm 3,1$). Después, estos islotes celulares fueron creciendo y expandiéndose de manera centrifuga, sustituyendo las células 3T3. Tras 28 días ($28 \pm 13,1$), todas las células alimentadoras habían sido sustituidas por queratinocitos. Tras la confluencia, los queratinocitos mostraron forma poligonal con apariencia normal.

La construcción de sustitutos de mucosa oral mediante ingeniería tisular fue llevada a cabo de manera eficiente usando frascos de cultivo porosos. Primero, se desarrolló un sustituto estromal compuesto por fibrina humana y agarosa al 0,1%. Insertados en esta matriz, los fibroblastos de mucosa

oral humana presentaron una proliferación muy rápida, adoptando forma elongada y extendiéndose por el entramado tras 1 a 3 días desde el cultivo. No se observó pérdida de volumen de los geles de fibrina-agarosa en ningún caso. Una vez que el sustituto estromal estuvo bien construido, los queratinocitos se sembraron en la capa superficial, y una monocapa confluyente de queratinocitos se observó entre los 7-10 días. La estratificación del epitelio de mucosa oral apareció tras 2 semanas de exposición de las células al aire en el medio de cultivo (técnica aire-líquido).

La evaluación histológica de la mucosa oral artificial reveló que las células epiteliales tendían a presentar una forma normal, un epitelio estratificado con desmosomas y las células de la superficie mostraron diferentes patrones de diferenciación. En suma, el análisis inmunohistoquímico demostró similitudes fenotípicas con la mucosa oral normal, con expresión de citoqueratina 13 en las capas más superficiales y ausencia de expresión de citoqueratina 10. La apariencia macroscópica de la mucosa oral reconstruida mostró que era un tejido relativamente consistente, permitiendo la realización de suturas en ella.

DISCUSIÓN

La construcción de un sustituto de mucosa oral artificial mediante ingeniería tisular supone un gran reto para la ciencia.

El uso de estos tejidos es de gran utilidad en algunas cirugías tal como la maxilofacial, ya que los pacientes necesitan grandes reconstrucciones en la cavidad oral, sin tener tejido adecuado para realizarlo^(5,26-28). Además, los sustitutos de mucosa oral generados en el laboratorio se podrán usar como modelos *in vitro* en investigaciones de farmacología experimental y test toxicológicos, sin necesidad de animales de experimentación.

En este trabajo hemos aislado, mantenido y evaluado la viabilidad de los dos tipos principales de células que presenta la mucosa oral. Después se ha elaborado un sustituto estromal hecho con fibroblastos sobre un soporte de fibrina humana y agarosa⁽²²⁾. La determinación de la viabilidad de los queratinocitos y los fibroblastos es un nuevo paso en la construcción de mucosa oral artificial mediante ingeniería tisular. Para conseguirlo, se ha usado microanálisis asociado a microscopía electrónica. Esta técnica es un procedimiento bien establecido para la evaluación de la viabilidad de los cultivos celulares, desde que se estableció que solamente las células viables presentan utilidad clínica⁽⁸⁾. La principal ventaja de este método es la detección de células en proceso de muerte, pero que conservan la integridad de la membrana. En comparación con otros métodos como el azul tripán o marcaje con yoduro de propidio⁽⁷⁾, el microanálisis con rayos X permite al investigador analizar el perfil iónico de las células mediante la determinación de las concentraciones celulares de elementos fundamentales como el Na o el K. Diferentes estudios mues-

tran que las concentraciones intracelulares de Na y K son un excelente marcador de la viabilidad de las células, el ratio K/Na es uno de los mejores parámetros para objetivar el daño celular^(9,10,13).

En este contexto, el uso de epitelio y estroma oral humano para la construcción de órganos artificiales mediante ingeniería tisular siempre requiere la determinación previa de la viabilidad celular para asegurar que son células aptas y funcionales. En este estudio, hemos investigado el contenido total de sodio, magnesio, fósforo, cloro, potasio y calcio en los queratinocitos y fibroblastos orales, usando el microanálisis por rayos-X. De acuerdo con nuestros resultados, los cultivos primarios de fibroblastos y queratinocitos usados en este trabajo mostraron niveles iónicos que corresponden con células viables. La elevada concentración intracelular de fósforo y potasio fue un buen marcador de la viabilidad celular, especialmente en asociación con bajos niveles de sodio^(9,10,29). En comparación con diferentes estudios, se ha demostrado que las células que han iniciado el proceso de apoptosis muestran bajas concentraciones intracelulares de potasio y cloro, incluso desde el inicio del proceso apoptótico^(8,29). Este descenso en los niveles de potasio y sodio muestra una relación directa con la pérdida de volumen celular asociado al proceso de muerte celular programada^(30,31). Por este motivo, el microanálisis cuantitativo de los iones intracelulares está llamado a ser un excelente método para la determinación, no sólo de la viabilidad celular, sino también es un buen predictor de la funcionalidad futura de las células creadas mediante ingeniería tisular.

Cuando las células se cultivaron y su viabilidad confirmada mediante microanálisis, se desarrolló un modelo de mucosa oral artificial usando sustitutos estromales. Muchos autores han desarrollado diferentes modelos de mucosa oral artificial usando sustitutos estromales de colágeno. Sin embargo, el uso de geles de colágeno presenta el inconveniente de que en la mayoría de los casos los fibroblastos determinan una disminución de volumen del hidrogel⁽³²⁻³⁴⁾. Otros grupos, sin embargo, han usado matrices de fibrina como sustitutos estromales para diferentes tejidos^(19,20,35-37). Sin embargo, las propiedades mecánicas de los geles de polímero de fibrina pura no son comparables al estroma de la mucosa oral en lo referente a la consistencia y a la elasticidad. Intentando simular las propiedades mecánicas de la mucosa oral, hemos usado una mezcla de fibrina y agarosa al 0,1%⁽²²⁾. Los estromas artificiales de fibrina y agarosa han demostrado mejor consistencia que la fibrina sola, permitiéndonos realizar suturas en los constructos. Además, los hidrogeles de fibrina-agarosa no pierden volumen, como ocurre con los geles de colágeno, incluso cuando las células estromales están inmersas en ellos⁽²⁴⁾. En suma, la fuente de fibrina usada en este estudio (plasma humano) tiene varias ventajas, especialmente la presencia de citoquinas sanguíneas y diversos factores de crecimiento como el derivado de las plaquetas. Todas estas proteínas presentes en el plasma son funcionales, lo cual supone un ambiente idóneo para la proliferación de los queratinocitos⁽³⁸⁾.

Para desarrollar un sustituto eficiente de mucosa oral humana, hemos usado una técnica de cultivo secuencial usando recipientes para cultivo ya comercializados⁽¹⁵⁾. Estos recipientes se han usado por dos razones. Primero, presentan una membrana porosa que permite que los nutrientes del medio de cultivo pasen a las células. Segundo, el diseño de estos recipientes nos permitió el uso de una técnica aire-líquido para promover la estratificación del epitelio.

Por otro lado, la evaluación microscópica de la mucosa oral artificial reveló la presencia de epitelio estratificado en la superficie de los sustitutos estromales. El uso de matrices de fibrina-agarosa permitió que los fibroblastos crecieran y proliferaran y, al mismo tiempo, indujo la adherencia y maduración en su superficie del epitelio estratificado. La fibrina, el componente principal del estroma en ingeniería tisular, es una proteína natural, muy abundante en la sangre, que es reconocida por los fibroblastos, de tal manera que son capaces de generar fibras de colágeno y organizar progresivamente una malla tridimensional. También, el análisis ultraestructural ha demostrado que los queratinocitos orales forman una multicapa con numerosos desmosomas y uniones intercelulares complejas. Sorprendentemente, numerosos modelos de diferenciación epitelial fueron observados en la superficie del epitelio generado, incluyendo microvellosidades y líneas paralelas de microplicaturas. La presencia de estos tipos de especializaciones celulares ha sido asociada con el proceso de diferenciación normal de los queratinocitos orales^(25,39), y sugiere que el epitelio oral generado mediante ingeniería tisular es muy similar al epitelio de la mucosa oral nativa. Inmunohistoquímicamente mostró similitudes entre la mucosa oral nativa usada como control y el epitelio construido, con una elevada expresión de citoqueratina 13 en las capas suprabasales, mientras que el análisis por microarray demostró que las células de los constructos no mostraban un proceso de muerte celular programada (apoptosis) y presentaban capacidad para proliferar. Estos resultados son compatibles con los alcanzados por otros autores usando diferentes tipos de matrices extracelulares^(40,41). Como conclusión, nuestros resultados indican que el cultivo de queratinocitos orales humanos es capaz de integrarse físicamente en un lecho de fibrina-agarosa, adhiriéndose y diferenciándose en la superficie del estroma. Estos resultados sugieren que los constructos de mucosa oral basados sobre una matriz de fibrina-agarosa adquieren progresivamente patrones de expresión histológicos de citoqueratinas similares a los controles de mucosa oral normal. Además, los complejos fibrina-agarosa descritos en este estudio parecen satisfacer los criterios para biomateriales usados en ingeniería tisular para la mucosa oral humana.

FINANCIACIÓN

Este estudio ha sido financiado por el proyecto FIS 03/0141 y FIS 04/1306 del Ministerio de Sanidad y Consumo (Instituto de Salud Carlos III) y por CM 2005/011 de la Junta de Andalucía.

BIBLIOGRAFÍA

- Schultze-Mosgau S, Lee BK, Ries J, Amann K, Wiltfang J. In vitro cultured autologous pre-confluent oral keratinocytes for experimental prefabrication of oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33: 476-485.
- Song J, Izumi K, Lanigan T, Feinberg SE. Development and characterization of a canine oral mucosa equivalent in a serumfree environment. *J Biomed Mater Res.* 2004; 71: 143-53.
- Baumann I, Greschniok A, Bootz F, Kaiserling E. Free transplanted, microvascular anastomosed forearm flap for reconstruction of the mouth cavity and oropharynx. Clinical and morphologic findings with special reference to reinnervation. *HNO.* 1996; 44: 616-623.
- Toft K, Keller GS, Blackwell KE. Ectopic hair growth after flap reconstruction of the head and neck. *Arch Facial Plast Surg.* 2000; 2: 148-150.
- Lauer G, Schimming R. Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: a clinical and immunohistologic study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 59: 169-175.
- Bergert H, Knoch KP, Meisterfeld R, Jager M, Ouwendijk J, Kersting S, Saeger HD, Solimena M. Effect of oxygenated perfluorocarbons on isolated rat pancreatic islets in culture. *Cell Transplant.* 2005; 14: 441-448.
- Chen J, Wagner MC. Altered membrane-cytoskeleton linkage and membrane blebbing in energy-depleted renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 280: 619-627.
- Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp. Cell Res.* 1999; 253: 454-462.
- Roomans GM. Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur Cell Mater.* 2002; 18: 1-8.
- Roomans GM. X-ray microanalysis of epithelial cell sinculture. *Methods Mol Biol* 2002; 188: 273-289.
- Somlyo AV, Shuman H, Somlyo AP. Electron probe X-ray microanalysis of Ca²⁺, Mg²⁺, and other ions in rapidly frozen cells. *Methods Enzymol.* 1989; 172: 203-229.
- Fernandez-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A. Electron probe X-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int.* 1997; 21: 665-669.
- Warley A. The preparation of cultured cells for X-ray microanalysis. *Scanning Microsc.* 8, 129-137.
- Orwin EJ, Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng.* 2000; 6: 307-319.
- Reichl S, Muller-Goymann CC. (). The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm.* 2003; 250: 191-201.
- Tegtmeier S, Papantoniou I, Muller-Goymann CC. Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm.* 2001; 51: 19-125.
- Chen J, Li Q, Xu J, Huang Y, Ding Y, Deng H, Zhao S, Chen R. Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artificial Organs* 2005; 29: 104-113.

18. Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, Martin C, San Roman F, Tevar F. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*. 1998; 24: 621-630.
19. Llames SG, Del Rio M, Larcher F, Garcia E, Garcia M, Escamez MJ, Jorcano JL, Holguin P, Meana A. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation*. 2004; 77: 350-355.
20. Llames S, Garcia E, Garcia V, del Rio M, Larcher F, Jorcano JL, Lopez E, Holguin P, Miralles F, Otero J, Meana A. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank* 2006; 7: 47-53.
21. Aufderheide AC, Athanasiou KA. Comparison of scaffolds and culture conditions for tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng*. 2005; 11: 1095-1104.
22. Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Muñoz-Avila JJ, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47: 3311-3317.
23. Rheinwald J, Green H. Serial cultivation of stains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975; 6: 331-344.
24. Reichl S, Bednarz J, Muller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol*. 2004; 88: 560-565.
25. Sanchez-Quevedo MC, Moreu G, Campos A, García JM, González-Jaranay M. Regional differences in cell surface patterns in normal human sulcular epithelium. *Histol Histopathol*. 1994; 9: 149-153.
26. Ueda M, Ebata K, Kaneda T. In Vitro fabrication of bioartificial mucosa for reconstruction of oral mucosa: Basic research and clinical application. *Ann Plast Surg*. 1991; 27: 540-549.
27. Schlenz I, Korak KJ, Kunstfeld R, Vinzenz K, Plenk H Jr, Holle J. The dermis-prelaminated scapula flap for reconstructions of the hard palate and the alveolar ridge: a clinical and histologic evaluation. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 108: 1519-1524.
28. Izumi K, Feinberg SE, Iida A, Yoshizawa M. Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 32: 188-197.
29. Arrebola F, Zabiti S, Canizares FJ, Cubero MA, Crespo PV, Fernandez-Segura E. Changes in intracellular sodium, chlorine, and potassium concentrations in staurosporine-induced apoptosis. *J Cell Physiol*. 2005; 204: 500-507.
30. Barbiero G, Duranti F, Bonelli G, Amenta JS, Baccino FM. Intracellular ionic variations in the apoptotic death of L cells by inhibitors of cell cycle progression. *Exp Cell Res*. 1995; 217: 410-418.
31. Hughes FM, Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA. Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem*. 1997; 272: 30567-30576.
32. Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1999; 112: 343-353.
33. Bach AD, Bannasch H, Galla TJ, Bittner KM, Stark GB. Fibrin glue as matrix for cultured autologous urothelial cells in urethral reconstruction. *Tissue Eng*. 2001; 7: 45-53.
34. Chinnathambi S, Tomanek-Chalkley A, Ludwig N, King E, DeWaard R, Johnson G, Wertz PW, Bickenbach JR. Recapitulation of oral mucosal tissues in long-term organotypic culture. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003; 270: 162-174.
35. Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents. *Ann Biomed Eng*. 2006; 34: 971-985.
36. Peretti GM, Xu JW, Bonassar LJ, Kirchoff CH, Yaremchuk MJ, Randolph MA. Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Eng*. 2006; 12: 1151-1168.
37. Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, Deschambeault A, Guerin SL, Auger FA, Bazin R, Germain L. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis*. 2006; 12: 65-75.
38. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998; 85: 638-646.
39. Moreu G, Sanchez-Quevedo MC, López-Escamez JA, Gonzalez-Jaranay M, Campos A. Cell surface patterns in normal human oral gingival epithelium. A quantitative scanning electron microscopy approach. *Histol Histopathol*. 1993; 8: 47-50.
40. Cho KH, Ahn HT, Park KC, Chung JH, Kim SW, Sung MW, Kim KH, Chung PH, Eun HC, Youn JI. Reconstruction of human hard-palate mucosal epithelium on de-epidermized dermis. *J Dermatol Sci*. 2000; 22: 117-24.
41. Igarashi M, Irwin CR, Locke M, Mackenzie IC. Construction of large area organotypical cultures of oral mucosa and skin. *J Oral Pathol Med*. 2003; 32: 422-430.