

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO Dr“ JOSÉ
ELEUTERIO. GONZÁLEZ”



ANÁLISIS BIOMECÁNICO DE OSIFICACIÓN EN DISTRACCIÓN
OSTEOGÉNICA MANDIBULAR UTILIZANDO TERAPIA GÉNICA *EX - VIVO*.
UN MODELO CANINO.

Por

Dr. Yanko Castro Govea.

Como requisito para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA.
ENERO del 2011
ANÁLISIS BIOMECÁNICO DE OSIFICACIÓN EN DISTRACCIÓN
OSTEOGÉNICA MANDIBULAR UTILIZANDO TERAPIA GÉNICA *EX - VIVO*.
UN MODELO CANINO.

Aprobación de tesis:

Dr. Augusto Rojas Martínez, M.D./D.Sc.
Director de Tesis

Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Co – Directora

Dr. med. Eduardo Álvarez Lozano
Comisión de Tesis

Dr. med. Oscar Mendoza Lemus
Comisión de Tesis

Dr. med. Jesús Áncer Rodríguez
Comisión de Tesis

Dr. med. Gerardo E. Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A dios.....
Que nunca me deja

Mi asesor Dr. Augusto Rojas Martínez.....

Gracias por su invaluable apoyo, dirección y asesoramiento

Dra. Herminia Martínez Rodríguez.....

Gracias infinitamente por su comprensión, paciencia y aliento.

Mi amigo y compañero de proyecto Dr. Víctor Cervantes Kardasch..

Fraternal entendimiento y demás historias....

**A todo el personal de los Deptos. de Bioquímica y Medicina Molecular,
Fisiología humana, Banco de Huesos y tejidos, todos ellos de la Facultad
de Medicina y del Hospital Universitario de la UANL,
Por coadyuvar de una manera relevante a este proyecto**

**A los Departamentos de Biomateriales y Resistencia de Materiales de la
Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (FIME)**

Por su gran ayuda y colaboración

A mis padres

Por ser sin duda, gran fuente de inspiración emocional.

Mis hermanos.....

*Todas las historias construidas en la infancia, aún se recuerdan con gran
emoción.*

Y finalmente a Brenda, Valeria y Megan.....

Gracias por su complicidad, amor, apoyo, e infinita paciencia.

A todos **GRACIAS.**

RESUMEN

El proceso de distracción craneofacial se concibe como la generación de tejido óseo por medio de dos segmentos vascularizados creados por una osteotomía, los cuales son separados gradual y progresivamente hasta alcanzar la elongación deseada. Este recurso ha sido aceptado ampliamente en el campo de la cirugía ortopédica y más recientemente, en el área de la cirugía craneofacial. Aunque la distracción ósea ha demostrado su eficacia, continúa siendo un procedimiento que requiere mucho tiempo para conseguir su objetivo, en particular el periodo de consolidación, por esa razón se han buscado métodos para acelerar este proceso. Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) son factores de crecimiento y transformación que promueven la osificación. La tipo 2 (BMP-2) está presente en todo el proceso de diferenciación de las células madre mesenquimales (CMM) en osteocitos. El uso de BMPs ha sido exitoso para acelerar el proceso de osificación en diferentes modelos mamíferos, pero poco se sabe de la calidad del hueso neoformado. En el presente trabajo, CMM caninas fueron transducidas *in vitro* con el vector adenoviral Ad-BMP-2 e incluidas en una matriz tridimensional y se probaron en un modelo canino de distracción mandibular. Se realizaron controles radiográficos de la consolidación ósea cada dos semanas durante 10 semanas, al término de las cuales los perros fueron sacrificados. La calidad del hueso mandibular neoformado se sometió a análisis histológicos *post mortem* y pruebas biomecánicas de resistencia y microdureza.

Firma del Director

Tabla de Contenido

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN.....	8
1.2 ANTECEDENTES.....	9
1.2.1 La distracción osteogénica.....	10
1.2.2 Biomateriales.....	12
1.2.3 Células madre y células madre mesenquimales.....	13
1.2.4 Factores de crecimiento y proteínas morfogenéticas de hueso.....	14
1.2.5 Vías de señalización de las BMPs.....	15
1.2.6 Capacidad Osteogénica de las BMPs.....	18
1.2.7 Terapia génica y vectores adenovirales.....	19
1.2.8 Propiedades biomecánicas del hueso.....	20

CAPÍTULO II

2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo General.....	23
2.2 Objetivos Particulares.....	23

CAPÍTULO III

3 ESTRATEGIA GENERAL.....	25
---------------------------	----

CAPÍTULO IV

4 METODOLOGÍA	27
4.1 Aislamiento de CMM	27
4.2 Modelo animal.....	28
4.3 Grupos de estudio.....	28
4.4 Estrategia general para la fabricación del Implante 3-C.....	29
4.5 Actividad biológica de la BMP-2 humana (hBMP-2) en CMM caninas.....	31
(estudios <i>in vitro</i>)	
4.6 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, cuantificación.....	31
relativa (qRT-PCR).	
4.7 Ensayos de Western blot.....	32
4.8 Regeneración ósea <i>in vitro</i>	32
4.9 Ensayos <i>in vivo</i>	33
4.10 Procedimiento quirúrgico.....	33

4.11 Técnica operatoria.....	34
4.12 Colocación del implante 3C y 2C.....	35
4.13 Parámetros de distracción osteogénica y estudios radiográficos	35
4.14 Pruebas de función hepática.....	36
4.15 Estudios histológicos.....	36
4.16 Preparación de las muestras y estudios biomecánicos.....	36
4.17 Análisis estadístico.....	39

CAPÍTULO V

5 RESULTADOS.....	41
5.1 Tipificación viral.....	41
5.2 Actividad biológica <i>in vitro</i> de la hBMP-2 transducida en CMM caninas.....	42
5.3 Seguimiento radiográfico del proceso de consolidación.....	44
5.4 Aspecto macroscópico a las 10 semanas de consolidación.....	46
5.5 Análisis histológico a las 10 semanas de consolidación.....	46
5.6 Pruebas biomecánicas.....	51
5.7 Parámetros para descartar toxicidad hepática.....	54

CAPÍTULO VI

6 DISCUSIÓN.....	56
------------------	----

CAPÍTULO VII

7 CONCLUSIÓN.....	61
REFERENCIAS.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos clínicos de Distracción Osteogénica de mandíbula.....	12
Figura 2. Rutas metabólicas de las BMPs en el proceso de osificación.....	17
Figura 3. Genoma esquemático un Ad-BMP-2 prototipo.....	20
Figura 4. Estrategia General.....	25
Figura 5. Estrategia general para la fabricación del Implante 3-C.....	30
Figura 6. Distractor mandibular diseñado por el Dr. Fuente del Campo.....	34
Figura 7. Prueba de resistencia por punto de inflexión.....	38
Figura 8. Prueba de Vickers con punta de diamante.....	38
Figura 9. Actividad biológica de la hBMP-2 en CMM caninas.....	43
Figura 10. Seguimiento radiográfico del proceso de consolidación.....	45
Figura 11. Aspectos macroscópicos del proceso de consolidación.....	47
Figura 12. Microfotografías del hueso neoformado.....	49
Figura 13. Seguimiento radiográfico, macroscópico y microscópico.....	50
Figura 14. Resultados de la prueba de flexión.....	52
Figura 15. Resultados de valores promedio de dureza Vickers HVN.....	53
Figura 16. Ejemplo: mediciones de huellas.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de estudio.....	29
Tabla 2. Resultados de las pruebas sanguíneas de toxicidad hepática.....	54

NOMENCLATURA

Ad-BMP-2	Vector adenoviral portador del gen BMP-2
Ad- β -gal	Vector adenoviral portador del gen de la beta-galactosidasa
ALB	Albúmina
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BMP	Proteína morfogenética de hueso
Bmpr	Receptor extracelular para BMPs
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
cm ³	Centímetros cúbicos
CMM	Células madre mesenquimales
Δ E1/E3	Genes deletados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E1, E3	Genes adenovirales de expresión temprana
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GGT	Gama-glutamil transpeptidasa
GLOB	Globulina
h	Hora
Implante-3C	Implante de 3 componentes
Kg	Kilogramo
LDH	Deshidrogenasa Láctica
mg	Miligramo
μ m	Microgramo

μl	Microlitro
mM	Concentración mili Molar
MOI	multiplicidad de infección
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
n	Número de repeticiones
nM	Concentración nano Molar
PT	Tiempo de Protrombina
qRT-PCR	Transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Gel de electroforesis de lauril sulfato de sodio y poliacrilamida
TB	Bilirrubina total
TGF- β	Superfamilia de factores de crecimiento y transformación . beta

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

La osteogénesis inducida ha revolucionado en gran medida el tratamiento de las malformaciones que cursan con hipoplasia del esqueleto craneofacial. Hoy en día es posible tratar aspectos hipoplásicos del tercio medio y superior. Sin embargo, continúa siendo su mayor uso el tratamiento de síndromes o enfermedades que cursen con hipoplasia de mandíbula. Existen diversos síndromes y enfermedades que cursan con hipoplasia maxilo-mandibular de diversas proporciones, como la secuencia de Pierre Robin, los síndromes de Nager y de microsomía hemifacial, entre otros. La microsomía hemifacial es la segunda malformación más frecuente, seguida del labio y paladar hendido.

Los beneficios que traduce la osteogénesis inducida son realmente asombrosos y han sustituido totalmente a los tratamientos tradicionales. La osteodistracción surgió, como muchos aspectos de la medicina, por serendipia. Actualmente, sus parámetros están más o menos establecidos y estandarizados, sin embargo continúa siendo un proceso prolongado para obtener resultados.

Sabemos que la regeneración ósea requiere por lo menos tres componentes: células, matriz ósea y factores de crecimiento adecuados. Dentro de los factores de crecimiento, las BMPs constituyen los factores primordiales para la regeneración ósea. En este sentido, continúan los esfuerzos para acelerar este proceso utilizando los componentes aisladamente o en combinación.

1.2 ANTECEDENTES

La distracción osteogénica ha sido aceptada ampliamente en el campo de la cirugía ortopédica y más recientemente ha sido aplicada en el área de la cirugía craneofacial (1). El primer reporte de distracción osteogénica aparece en 1905 y se debe a Codivilla, quien elongó un hueso largo de la extremidad. Con respecto al proceso de osteodistracción mandibular, Wassmund describe que Rosenthal realizó el primer procedimiento de este tipo en 1927, utilizando un dispositivo intraoral activado gradualmente durante un mes. En 1937, Kazanjian también realizó una distracción osteogénica mandibular de manera gradual (2). Sin embargo, fue Ilizarov quien popularizó esta técnica al aplicar clínicamente el principio de distracción osteogénica para el tratamiento de fracturas conminutas de huesos largos. Una vez reducidos los fragmentos, los alargaba para obtener la longitud deseada y de esta forma se evitaba la colocación de injertos óseos (3,4,5).

En 1982, Panikarovski *et al.* publicaron la primera evaluación histológica significativa de distracción osteogénica mandibular en 41 perros (6). Los autores reportaron dos zonas de mineralización con osteocitos primarios orientados longitudinalmente, así como una interzona fibrosa en la región central de la distracción, con fibras de colágena y capilares orientados paralelamente en la dirección del vector de la distracción. Los resultados de estos estudios demostraron que el mecanismo de regeneración ósea durante la distracción mandibular fue similar a la realizada durante la elongación de huesos de extremidades. Karp *et al.* realizaron un estudio experimental similar, con un mejor entendimiento y análisis de las diferentes etapas de formación ósea durante el proceso de distracción (7). Histomorfológicamente, la

regeneración ósea fue representada en cuatro zonas: una zona central de tejido fibroso, una zona de formación ósea extensa, una zona de remodelación ósea y una zona de maduración ósea.

En 1973, Snyder *et al.* fueron los primeros en realizar la distracción osteogénica para elongar la mandíbula en un modelo canino, usando un dispositivo extraoral (8). Dos años más tarde, Michieli y Miotti implementaron la elongación mandibular por medio de un dispositivo intraoral (9). En la actualidad existen diversos estudios experimentales sobre la elongación mandibular por distracción osteogénica, con una amplia variedad de dispositivos externos e intraorales (1, 2). En 1989, McCarthy *et al.* fueron los primeros en aplicar clínicamente la técnica de osteodistracción extraoral en cuatro niños con anomalías craneofaciales congénitas con resultados favorables, los cuales fueron publicados cuatro años más tarde (10).

1.2.1 La distracción osteogénica

El proceso de distracción craneofacial es la generación de tejido óseo estimulado por dos segmentos óseos vascularizados creados por una osteotomía. Por medio de tracción mecánica es posible elongar el callo óseo de manera gradual y progresiva hasta obtener la longitud ósea deseada. Usualmente se colocan los tornillos intraóseos interconectados por un tornillo distractor a cada lado del corte, acto seguido se inicia el proceso de distracción, el tiempo comprendido entre la realización de la osteotomía y la activación de la distracción se le denomina periodo de latencia. La activación del tornillo distractor puede ser a un índice de una o dos vueltas diarias, (un giro de 360° al tornillo distractor equivale aproximadamente a 1 mm de elongación ósea). Una vez que se ha obtenido la elongación ósea requerida, se suspende la

distracción mecánica iniciando el periodo de consolidación, donde el dispositivo distractor permanecerá en su sitio para actuar como fijador externo, permitiendo la consolidación del hueso neoformado y concluyendo la última etapa de este proceso. La osificación se monitorea radiográficamente y se correlaciona con la clínica antes de retirar los tornillos distractores. El tiempo establecido como proceso de consolidación varía de un autor a otro, incluso para casos similares. Reportes en la literatura indican que el rango promedio que se establece como etapa de consolidación ósea es entre 6 a 8 semanas; sin embargo, puede ser tan prolongado como 12 a 16 semanas, por lo que este parámetro constituye la etapa más larga del proceso de distracción osteogénica (1, 2).

Sin duda que los beneficios de la distracción osteogénica han sido altamente satisfactorios (Figura 1). Sin embargo, continúa siendo un procedimiento que requiere mucho tiempo para conseguir su objetivo, en particular el periodo de consolidación.



Figura 1. Paciente Femenina de 14 años con Microsomía Craneofacial Hemifacial.
A y C. Aspecto preoperatorio. B y D. Aspecto postoperatorio, etapa de consolidación.

1.2.2 Biomateriales

Una meta de investigación de los biomateriales ha sido y continúa siendo el desarrollo de materiales implantables que induzcan de manera predecible, controlada y rápida la reparación de los tejidos, tanto duros como suaves, o en nuestro particular interés, que favorezcan una maduración y consolidación de tejido óseo más rápida (11, 21). Existen desde implantes sintéticos, hasta aquellos derivados de tejido óseo o sus componentes. De estos últimos, uno de los que ha demostrado mejores resultados son las matrices creadas a partir de hueso desmineralizado. La restauración de tejidos en los seres humanos

requiere del reclutamiento y proliferación de células capaces de devolverles forma y función. Las células involucradas en la regeneración recuerdan todo el proceso de desarrollo que llevó a la formación original del tejido.

1.2.3 Células madre y células madre mesenquimales

Las células madre, por definición son células con capacidades de proliferación y de diferenciación a distintos linajes celulares *in vivo* o *in vitro* (plasticidad celular), así, en condiciones fisiológicas estas células son las encargadas de regenerar y conservar los tejidos en las condiciones adecuadas para su correcta función (12, 13). Dentro de este grupo están las células mesenquimales, hematopoyéticas, progenitoras de endotelio y residentes en tejidos como las CM neuronales. Las células madre mesenquimales (CMM) representan un segundo grupo de células progenitoras que residen en la médula ósea, que anteriormente se les consideraba como las células del estroma o el sustrato celular de soporte para las células madre hematopoyéticas (14). La médula ósea es uno de los sitios de residencia de las CMM, además del tejido adiposo, umbilical y óseo trabecular. Estas células se diferencian cuando son liberadas a los tejidos y entran en contacto con los factores propios (15). Recientemente se ha demostrado la capacidad de las CMM *in-vitro* de convertirse en varios linajes de tejidos mesodérmicos funcionales, como osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos esqueléticos. Para conseguir esto, solo es necesario someter a las CMM en cultivo al estímulo adecuado y constante (16, 17). Las CMM se pueden usar como materia prima para terapia o bien como vehículo de terapia génica. Estas células tienen una aplicación potencial en la regeneración del tejido conectivo. Sin duda que apenas podemos imaginar las enormes posibilidades

terapéuticas de las CMM (18).

1.2.4 Factores de crecimiento y proteínas morfogenéticas de hueso

Los factores de crecimiento son polipéptidos solubles que tienen por función regular el crecimiento, diferenciación y metabolismo de múltiples células, entre ellas los osteocitos. La acción fundamental de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) es la diferenciación de las CMM en osteoblastos y osteocitos, así como la calcificación de la matriz extracelular (19). Una opción que empezó a estudiarse la década pasada, fue el uso de factores de crecimiento solos o en combinación, en un intento por promover y mejorar la regeneración ósea en modelos animales. Durante el proceso de osificación intervienen una serie de sustancias, liberadas entre otras células por los osteoclastos. Entre estas sustancias están las interleucinas IL-2 y IL-6, el factor de necrosis tumoral (TNF- β) y los factores de crecimiento y transformación β (TGF β) (20). Dentro de este grupo, se encontró que las BMPs son los factores osteoinductores más potentes que existen y que éstos pueden reducir el tiempo de consolidación hasta en la mitad del tiempo promedio. Estas proteínas son una familia de citocinas extracelulares, las cuales a través de un receptor transmembrana, activan toda una cascada de señalización para activar genes como la osteocalcina, osteopontina, colágena 1 y 9, sialoproteína de hueso y la fosfatasa alcalina. Estos factores son encargados de regular la diferenciación celular y modificar el espacio extracelular para generar la matriz proteica y participar en la precipitación de las sales minerales (21, 22). Se han identificado alrededor de 15 tipos diferentes de BMPs. Dentro de éstas destaca la BMP 2 por ser una de las pocas que participa durante todo el proceso (23, 24). La capacidad osteoinductora de las BMPs es tal, que pueden formar hueso

heterotrópico cuando la proteína purificada se inyecta en el dorso de ratones desnudos, también se ha conseguido reparar lesiones óseas extensas de 1 o 2 cm en huesos largos en conejos. Además se ha tenido éxito con trepanaciones craneales y procedimientos de distracción ósea en otros modelos animales como ratas y conejos (25, 26, 27).

1.2.5 Vías de señalización de las BMPs.

Si bien es cierto que los conocimientos respecto al modo de acción de las BMPs son recientes, el hecho es que aún no se conoce del todo como propician la acción osteogénica. Actualmente se conocen varias vías a través de las cuales se activan blancos transcripcionales que se pueden dividir en forma general: a) los encargados de la diferenciación celular, b) los encargados de modificar la matriz extracelular, y finalmente c) genes reguladores de la vía. Las BMPs requieren acoplarse extracelularmente a los receptores de BMP tipos I y II (Bmpr I y II) y este acoplamiento permite la fosforilación intracelular de las proteínas Smad, que son otra familia de proteínas TGF (28). Todas las vías comienzan con un modo de acción en común: la fosforilación de una Smad a través de Bmpr I y II. En la primera vía, Smad-1 fosforilada, activa el homeodominio Hox. Se destaca la activación de Hoxc8, el cual se une a la Smad-1 fosforilada formando un heterodímero que activa al gen de la osteopontina. Paradójicamente, para la BMP-2 se ha descrito que Hoxc8 es capaz de bloquear la vía general cuando forma un heterodímero con Smad-6 y se une intracelularmente a Bmpr-I y-II bloqueando la fosforilación de otras Smads. Alternativamente, las proteínas a fosforilar pueden ser Smad 1, 5 y 8. Cualquiera de éstas forma heterodímeros con Smad-4, que a su vez activa a Runx-2, a través de la cual se activan los genes COX-2, los colágenos tipo-1 y

10, la osteocalcina y la sialoproteína de hueso (29). En una vía adicional que es indirecta y de la que no se conocen todos los componentes, el heterodímero formado por Smad 4 y las Smads 1, 5 u 8 activa a Wnt3a, el cual es translocado al espacio extracelular, donde activa a catenina por medio del receptor extracelular Frizzled y la participación de la proteína Dickkopf-1(Dkk1). La β -catenina constituye por si misma un paso importante en el proceso de osificación, ya que activará a la fosfatasa alcalina, cuya actividad es necesaria para la precipitación de las sales de hidroxiapatita, el componente mineral más importante del hueso (30). Se ilustran las rutas metabólicas señaladas anteriormente (Figura 2). Recientemente se determinó que las BMPs son capaces de formar heterodímeros entre sus diferentes tipos. Aún se desconoce cuantas pueden hacerlo entre si, pero se cree que estos heterodímeros son capaces de activar vías alternas que completarían el esquema fisiológico de la osificación (31).

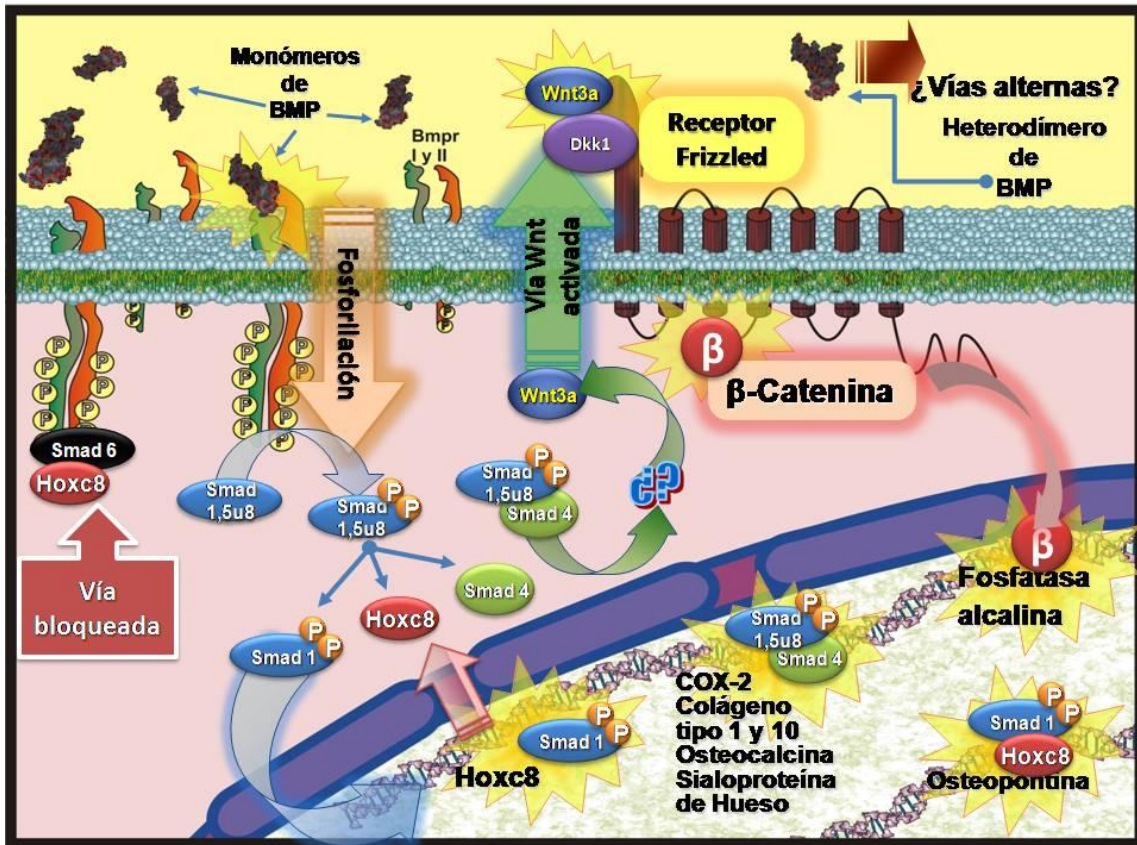


Figura 2. Rutas metabólicas de las BMPs en el proceso de osificación.

Las BMPs son citocinas que se liberan al medio extracelular. La activación de la ruta metabólica comienza con la unión de un monómero de BMP a los receptores transmembranales Bmpr tipos I y II, esta unión extracelular induce la fosforilación intracelular de las proteínas Smads tipos 1, 5 y 8 que les permite pasar a un estado activo. Las Smads activadas se dirigen hacia diferentes blancos transcripcionales: pueden actuar solas, como la Smad 1 que activa a Hoxc8 o formar heterodímeros. Por ejemplo, la misma Smad 1 se une a la proteína de su propio blanco transcripcional Hoxc8 para activar al gen osteopontina. La gran parte de genes son activados a través de heterodímeros que forman la Smads 1, 5 u 8 con la Smad 4, ya sea directamente o a través de la vía Wnt (por un intermediario aún desconocido). En el caso de la BMP-2, la vía se bloquea cuando el heterodímero formado por Smad 6 y Hoxc8 se une a la porción intracelular de Bmpr I y II evitando la fosforilación de otras Smads. La capacidad de las BMPs de formar heterodímeros entre sus diferentes tipos probablemente permita la activación de rutas alternas (28, 29, 30).

1.2.6 Capacidad Osteogénica de las BMPs

Se continúan investigando las amplias posibilidades terapéuticas de las BMPs. Los primeros ensayos consistieron en colocar el extracto de BMPs humanas dentro de una doble cobertura de acetato de celulosa en la pared abdominal de conejos, obteniéndose osteogénesis *in situ*; para entonces ya se había determinado que las BMPs no tienen actividad específica de especie (32). Se ha ido determinando el potencial osteogénico de cada BMP de manera individual a lo largo de tres décadas y la mayoría de los tipos son capaces de inducir la formación de hueso ectópico. El más importante de estos estudios fue desarrollado por Cheng, H, *et al.* (33). La versatilidad de las BMPs es tal, que son capaces de osteoconducir prácticamente a cualquier línea celular que se encuentre dentro del rango mesenquimal. Además, en el adulto, la actividad de las BMPs es localizada, lo cual las hace muy seguras de utilizar. Con base en estos conocimientos, la Asociación de Alimentos y Medicinas de Estados Unidos (FDA, en inglés) ha autorizado el uso de las BMPs 2 y 7 para su uso en ensayos clínicos y varias más se encuentran actualmente en investigación. El gran inconveniente de las BMPs es que su vida media es muy corta (pocas horas) y para lograr una neoformación ósea exitosa se requieren algunas semanas de exposición; inclusive en ensayos *in vitro* los primeros indicios de osificación aparecen alrededor del décimo día. La solución ideal sería una alternativa que nos permita mantener este estímulo por periodos más prolongados (34, 35).

1.2.7 Terapia génica y vectores adenovirales

Por las razones antes mencionadas, se continúa investigado el potencial uso terapéutico de las BMPs y sin duda los mejores logros experimentales han sido mediante el uso de la terapia génica, utilizando vectores adenovirales de segunda generación para que transporten los genes de las BMPs. Cuando los vectores son introducidos en las CMM, liberan el gen terapéutico en el núcleo y esta transducción permite incrementar considerablemente los niveles de BMPs en el sitio blanco, favoreciendo la osificación (36, 37). Los vectores adenovirales, principalmente basados en el adenovirus 5, son actualmente los más usados, porque son seguros y poseen altos índices de transducción (Figura 3).

La terapia adenoviral se ha usado tanto *in vivo* como *ex vivo* y estas modalidades se han probado con éxito en mamíferos pequeños (38, 39). Sin embargo la terapia *in vivo* en mamíferos grandes hasta el momento no ha sido exitosa, ya que la respuesta inmune que despiertan los adenovirus inhibe la terapia génica en un plazo cercano a un mes (40,41,42). Actualmente, los estudios experimentales con la terapia *ex vivo*, donde teóricamente se limitaría esta respuesta, solo ha sido investigada en mamíferos pequeños y no ha sido probada en mamíferos grandes.

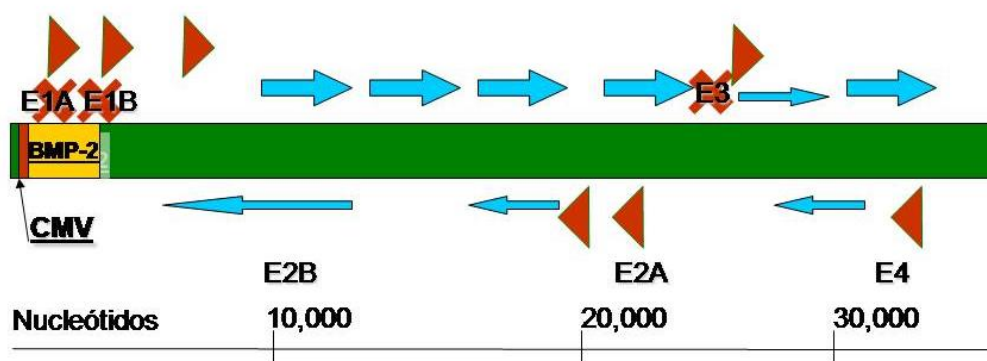


Figura 3. Genoma esquemático de un Ad-BMP-2 prototipo.

Este esquema se basa en el Ad-BMP-2 publicado por Betz, et al. (2005). Tiene deleciones en los genes E1A, E1B, espacio en el cual se colocó la secuencia codificante del gen BMP-2 y la secuencia promotora del citomegalovirus (CMV). El gen E3 también se encuentra deletado para facilitar el empaquetamiento.

1.2.8 Propiedades biomecánicas del hueso.

El hueso por su constitución posee cualidades físicas de dureza y resistencia necesarias para la función de soporte que desempeña. La mandíbula por ejemplo está diseñada para soportar la masticación. Diversas son las pruebas a las que puede ser sometido un hueso para verificar su calidad, éstas proveen información cuantitativa de las propiedades mecánicas, entre las más comunes está la prueba de flexión, la cual consiste en flexionar la pieza de hueso apoyándola en tres o cuatro puntos. Esta prueba tiene la ventaja que puede ser diseñada para probar la pieza anatómica completa o en segmentos cortados o maquinados. Aunque probar la pieza completa es más realista, resulta más representativo el uso de segmentos modelados que permiten unificar la geometría de los especímenes a analizar, facilitando la estandarización de las pruebas. Sin embargo, requieren de la fabricación de implementos específicos para la pieza a probar (43). El resultado de esta prueba arroja información sobre el momento de la inercia en la cual el hueso

cede. Diversos estudios han mostrado que el daño más común que resulta de esta prueba, dependiendo del estrés al que el hueso es sometido, es el daño difuso que tiene como efecto una disminución general en la fuerza del hueso, y aparecen microfracturas por acumulación de daño extenso (43). La prueba de microdureza se realiza presionando una punta de diamante sobre la superficie ósea y mide el grado de penetración de la misma (44).

A pesar que en muchos estudios se ha demostrado en menor o mayor medida la utilidad de las BMPs para acelerar el proceso de osificación, poco se sabe acerca de las características biomecánicas que adquiere el tejido neoformado y si la calidad está comprometida en comparación con el hueso nativo.

El propósito principal de este estudio fue analizar las propiedades biomecánicas del tejido óseo neoformado y acelerado con distracción osteogénica mandibular en un modelo canino. Para este efecto se construyó un implante de células madre mesenquimales modificadas con BMP2 humana y se mezclaron con matriz ósea desmineralizada, todo esto empleando técnicas de terapia génica y de ingeniería de tejidos.

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Establecer si el hueso neoformado durante la distracción osteogénica mandibular, desarrolla las características biomecánicas normales cuando éste es inducido por la sobreexpresión del gen de la BMP-2, con terapia génica *ex vivo* en un modelo canino.

2.2 Objetivos particulares

2.2.1 Desarrollar un modelo canino de distracción mandibular.

2.2.2 Evaluar el periodo de consolidación con y sin el uso de terapia génica *ex-vivo* a través de un seguimiento radiográfico.

2.2.3 Determinar la calidad del hueso neoformado mediante exámenes histológicos y pruebas biomecánicas de resistencia y microdureza.

2.2.4 Comprobar la bioseguridad del uso de vectores adenovirales en terapia génica *ex- vivo* mediante parámetros de toxicidad hepática.

CAPÍTULO III

3. ESTRATEGIA GENERAL

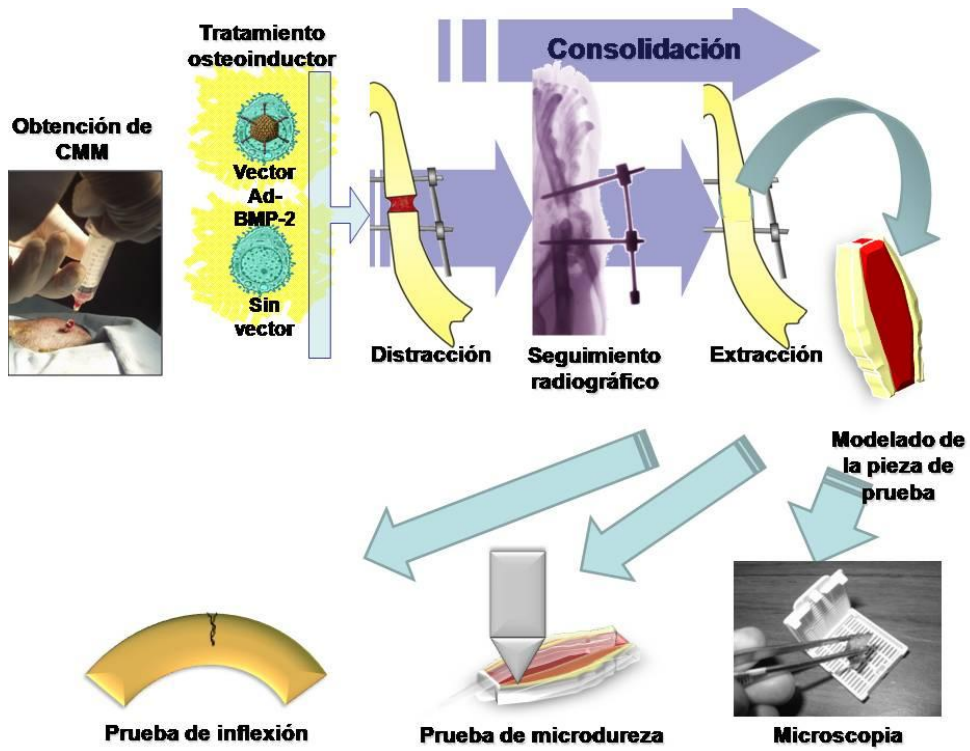


Figura 4. Estrategia general

CAPÍTULO IV

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Este protocolo fue efectuado con animales de laboratorio, cumpliendo con los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el manejo de animales de laboratorio (NOM 062-ZOO-199). Este trabajo experimental fue efectuado con la colaboración del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular donde se realizó la producción adenoviral y los ensayos *in-vitro*; del Servicio de Cirugía Plástica, que proporcionó el equipo quirúrgico y personal asistente para las cirugías; del Departamento de Fisiología, que facilitó las instalaciones y personal especializado para el manejo de los animales de laboratorio; del Banco de Hueso y Tejidos que donó la matriz de hueso desmineralizado (MHD), todos ellos de la Facultad de Medicina y del Hospital Universitario de la UANL; así como con los Departamentos de Biomateriales y Resistencia de Materiales de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (FIME) de la UANL, donde se realizaron las pruebas de resistencia y microdureza. El vector adenoviral (Ad-BMP-2) fue proporcionado por el Dr. Christopher Evans del Molecular Orthopedics Harvard Medical School de Boston, Massachusetts (Figura 4. Estrategia General).

4.1 Aislamiento de CMM.

Para este efecto se utilizaron CMM autólogas las cuales fueron obtenidas a partir de aspirados de médula ósea de la cabeza humeral de los perros. Posteriormente el tejido recolectado fue fragmentado y digerido con tripsina al 0.25% + colagenasa tipo II a una concentración de 1 mg/ml. Las CMM fueron recuperadas por centrifugación y separadas por adherencia en frascos de cultivo con medio mínimo modificado de Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium o DMEM) con 20% de suero bovino fetal, 0.1% de

gentamicina, 1% de anfotericina B, 1% de ampicilina/kanamicina y glicerolfosfato a una concentración de 20mM como fuente de sales minerales. El medio fue cambiado cada 24 h hasta alcanzar confluencia de 70% (alrededor de 7–10 días). Cuando fue necesario se realizaron hasta dos pasajes para obtener alrededor de 1.5×10^7 células en total. La MHD fue procesada y liofilizada en el Banco de Hueso del Hospital Universitario de la UANL.

4.2 Modelo animal.

En este protocolo experimental se utilizaron perros mongrel de 1 a 3 años de edad de 20 a 25 Kg. de peso. Los animales fueron alimentados y suplementados con croquetas durante 2 semanas previas al procedimiento quirúrgico y hasta el final del protocolo. Estos recibieron los cuidados por médicos veterinarios y estuvieron confinados en el bioterio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina UANL, según la NOM 062-ZOO-1999.

4.3 Grupos de estudio.

Se dividió en 3 grupos experimentales con tres perros por cada grupo (tabla 1): Grupo a) Perros tratados con distracción osteogénica mandibular (DOM) que recibieron un implante de 3 componentes fabricado con la combinación de CMM previamente transducidas con el vector Ad-CMV-BMP-2 y embebidas en MHD. Grupo b) Perros tratados con distracción osteogénica mandibular que recibieron un implante de solo 2 componentes, CMM no transducidas y embebidas en MHD. Grupo c) Perros tratados únicamente con DOM (Grupo control).

Gpo	N	Latencia a días	Índice y ritmo	Consolidación semanas	Tipo de implante		
					Implante-3c	Implante-2C Sin vector	Control
A	3	0	1 mm x día	10	X		
B	3	0	1 mm x día	10		X	
C	3	0	1 mm x día	10			X

Tabla 1. Grupos de Estudio

4.4 Estrategia general para la fabricación del Implante-3C

El implante-3C se construyó de la siguiente manera: se sembraron 1.5×10^7 CMM de médula ósea del perro, las cuales fueron transducidas con el vector Ad-BMP-2 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1×10^4 partículas virales por célula. Pasadas 12 horas postransducción, se recuperaron las CMM transducidas y se lavaron del exceso de vector, finalmente se mezclaron con 0.25 cm^3 de matriz de hueso desmineralizado (MHD) y justo antes del evento quirúrgico. Simultáneamente se comprobó la transducción del vector mediante la detección de la BMP 2 humana por Western – blot (Figura 5).

Componentes del Implante:

- 1.- Primer componente: Células Madre Mesenquimales (CMM)
- 2.- Segundo componente: CMM transducidas con el vector adenoviral que expresa la BMP2 humana, (Ad-CMV-BMP-2).
- 3.-Tercer componente: Matriz de hueso desmineralizado (MHD)

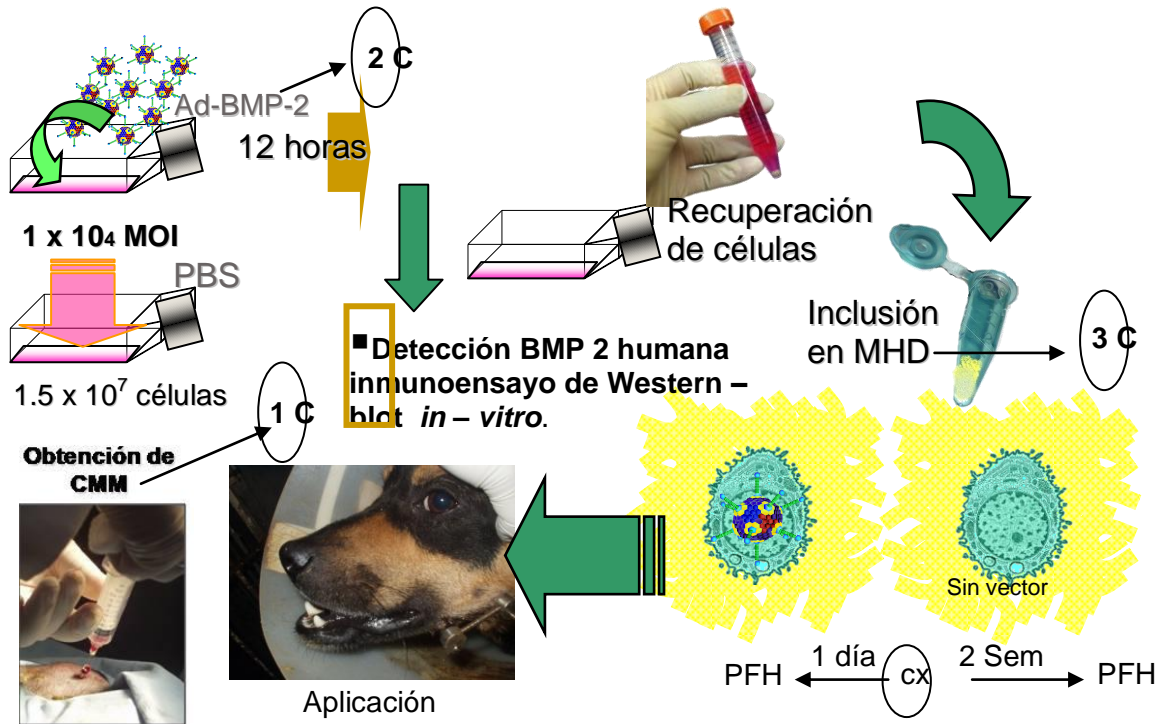


Figura 5. Estrategia general para la fabricación del Implante-3C por terapia *ex-vivo*

4.5 Actividad biológica de la BMP-2 humana (hBMP-2) en CMM caninas (estudios *in vitro*).

Las CMM (1×10^5 células) fueron transducidas durante toda la noche con el Ad-CMV-BMP-2 a 1×10^3 – 1×10^5 multiplicidades de infección (MOI) en placas de 96 pozos. El medio fue reemplazado completamente postransducción y cada 24h, mientras duró el experimento. Como control negativo se usaron células no transducidas y transducidas con el vector Ad- β galactosidasa (Ad- β gal). Como control positivo se usaron células no transducidas a las que se les añadió dexametasona 1 nM. Las pruebas de actividad biológica incluyeron la cuantificación relativa de la transcripción del mRNA de fosfatasa alcalina (ALP) mRNA y la expresión proteica del colágeno tipo 1 canino. Los experimentos fueron observados a las 24, 48 y 96 h postransducción.

4.6 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, cuantificación relativa (qRT-PCR).

Se utilizó la técnica de qRT-PCR para cuantificar la producción de mRNA de ALP. Para esto el RNA fue aislado a las 24, 48 y 96 h postransducción utilizando el estuche de extracción Versagene kit (Gentra Systems Inc. Minneapolis, MN) y el cDNA fue sintetizado con el estuche de retrotranscripción Superscript Platinum con SYBRGreen (Invitrogen, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de mRNA de ALP se utilizaron los cebadores específicos 5-TGGAACCGCACGGAAGCTC-3' (sentido) y 5-GCTCAAAGAGACCCAAGAGGTAGT-3'(anti sentido). Para normalizar los resultados se cuantificó la expresión del mRNA de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) usando los cebadores 5-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3' (sentido) y 5'-

CGCCCCACATTGATTTTGG-3' (anti sentido). La qRT-PCR fue desarrollada en un equipo ABI-7000 (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA).

4.7 Ensayos de Western blot.

Para evaluar la funcionalidad de las CMM transducidas se procedió a identificar la presencia de las proteínas hBMP-2 y el colágeno tipo 1 canino por análisis de Western blot. Se usaron 80 µg de proteínas totales, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel SDS-PAGE al 12% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Una vez transferida la membrana, se bloqueó con buffer de fosfatos (PBS) y con leche descremada al 5%. Para detectar la hBMP-2 y el colágeno tipo 1 canino se utilizaron los anticuerpos primarios IgG policlonal de cabra anti-BMP-2 humana (dilución 1:100) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) e IgG monoclonal de ratón anti-COL1 canina (dilución 1:100) (Abcam PLC, Cambridge, UK), respectivamente. Como control se utilizó hBMP-2 comercial (Santa Cruz Biotechnology Inc.). La reacción antígeno-anticuerpo se detectó con PBS con leche descremada al 5%, con peroxidasa de rábano y con los anticuerpos conjugados IgG de pollo anti-cabra e IgG de cabra anti-ratón, dirigidos contra los anticuerpos humanos (por reacción cruzada contra el anticuerpo de cabra) y contra ratón, respectivamente. Los ensayos fueron revelados con diaminobencidina.

4.8 Regeneración ósea *in vitro*.

Para este efecto se usaron los mismos grupos experimentales que se mencionaron arriba. Las CMM se recuperaron tras una noche postransducción; éstas se lavaron en 3 ocasiones en PBS y fueron embebidas en MHD e incubadas en placa de 96 pozos por 10 días. El medio de cultivo fue cambiado

cada 24 h y al término de los 10 días los implantes fueron incluidos en medio de congelación Tissue-Tek (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA) para realizar criocortes. Para los estudios de microscopía los criocortes se tiñeron con las técnicas de hematoxilina y eosina (H&E), tricrómica de Gomori y von Kossa para evaluar los patrones histológicos de la matriz de colágeno y calcificación ósea *in vitro*.

4.9 Ensayos *in vivo*.

Para crear los implantes 3C se cultivaron 1.5×10^7 CMM caninas y fueron transducidas durante toda la noche a una MOI de 1×10^4 . A la siguiente mañana las células fueron lavadas con PBS en 3 ocasiones para eliminar el excedente de vectores. Las CMM modificadas fueron recuperadas con tripsina al 0.25% y resuspendidas en DMEM libre de suero. La suspensión de células se usó para reconstituir 0.25 cm^3 de polvo de MHD. El implante control se construyó utilizando CMM no transducidas usando el mismo protocolo.

4.10 Procedimiento quirúrgico.

La cirugía fue realizada bajo condiciones estériles utilizando anestesia general con pentobarbital sódico al 4 % IV (1 mm/2.25 Kg.). Se administró analgesia postoperatoria con hidrocloreto de buprenorfina (temgesic) IM (0.01 mg/Kg.). Se administró antibiótico durante y después del procedimiento por cinco días. El distractor aplicado fue desarrollado por el Dr. Fuente del Campo (Hospital "Gea González", UNAM) que consiste en las siguientes piezas de acero inoxidable: dos tornillos intraóseos colocados en ambos extremos de la corticotomía, dos cilindros (uno de distracción y otro de apoyo), y un tornillo distractor que se colocó a través del cilindro distractor para terminar en el

cilindro de apoyo (Figura 6).

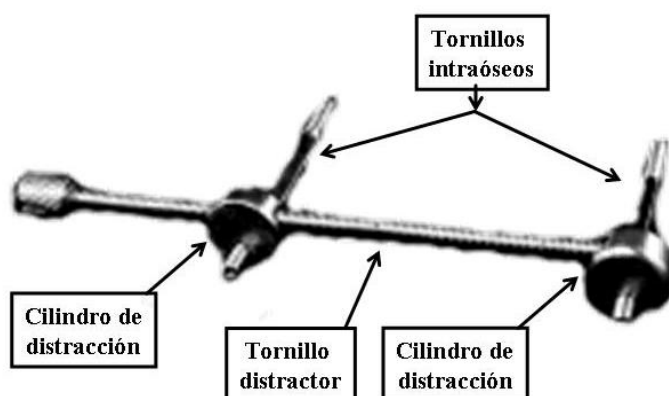


Figura 6. Distractor mandibular diseñado por el Dr. Fuente del Campo. Consiste en dos tornillos intraóseos, dos cilindros (distractor y de apoyo) y un tornillo de distracción.

4.11 Técnica operatoria.

Bajo anestesia general y previa asepsia y antisepsia, incluyendo cavidad oral (solución antiséptica iodopovidona al 1 %), se procedió a infiltrar el surco vestibular y cara anterior del cuerpo mandibular con solución vasoconstrictora (xilocaína al 1% y epinefrina 1:100,00). Acto seguido, se realizó una incisión en el vestíbulo inferior derecho de aproximadamente 3 cm. y se disecó subperióticamente parte del ángulo mandibular y distal de la rama. Conservamos al máximo la integridad de la irrigación del periostio y endostio. Se dibujó la dirección de la corticotomía del borde alveolar al ángulo mandibular; posteriormente, con una fresa de 2 mm se trazó la corticotomía, la cual fue ampliada con un osteotómo hasta llegar a la esponjosa. Se incluyó totalmente la cortical externa del borde alveolar al mandibular, prolongándose a la cortical interna de ambos lados y dejando un puente de cortical interna donde cruza el paquete neurovascular, el cual fue fracturado una vez colocado el dispositivo distractor. Esta maniobra permitió obtener estabilidad.

Posteriormente, por vía percutánea se realizaron dos incisiones de aproximadamente 5 mm a través de las cuales se introdujo en forma roma una guía de perforación percutánea de 4 mm con trocar. Acto seguido se retiró el trocar para introducir a través de esta guía una broca de 1.7 mm de diámetro para realizar dos perforaciones a un centímetro de cada lado de los bordes de la corticotomía. Finalmente se colocaron los tornillos intraóseos a cada lado de la corticotomía, perpendiculares al plano de superficie y paralelos entre sí.

4.12 Colocación del implante 3C y 2C.

Los implantes-3C o 2C, se colocaron inmediatamente en el sitio de la corticotomía en los respectivos grupos y fueron cubiertos con periostio para retenerlos y asegurar una mejor vascularidad. Se corroboró hemostasia para finalmente realizar el cierre de la incisión vestibular con sutura vicryl 4-0.

4.13 Parámetros de distracción osteogénica y estudios radiográficos.

El periodo de latencia para todos los grupos fue de 0 días, es decir se inició la distracción inmediatamente al término de la cirugía. A todos los grupos se le realizó distracción osteogénica a razón de 1 mm por día durante 10 días hasta obtener un espacio de 1 cm. Finalmente a todos los grupos se les dejó un periodo de consolidación de 10 semanas, tiempo durante el cual se realizaron controles radiográficos de mandíbula cada dos semanas hasta concluir el estudio.

Después de la cirugía se colocaron embudos en la cabeza (collar isabelino) para asegurar la permanencia de los dispositivos, evitando también que los perros se lastimaran y provocaran dolor; la alimentación fue a base de alimento especial para perros (croquetas).

4.14 Pruebas de función hepática.

Un día previo a la cirugía y dos semanas después del evento quirúrgico se realizaron pruebas de función hepática para descartar toxicidad por el uso de vectores adenovirales. Estos incluyeron los siguientes parámetros: Proteínas totales (PT), concentración de albúmina (ALB), globulina (GLOB), bilirrubina total (TB), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), ALP, deshidrogenasa láctica (LDH) y gamma-glutamil transpeptidasa (GGT).

4.15 Estudios Histológicos.

Al término de las 10 semanas del periodo de consolidación los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital/KCl vía intravenosa y las mandíbulas obtenidas fueron sometidas a estudios histológicos para evaluar las características de proceso predeterminado del periodo de consolidación. Las áreas de hueso tratado (tejido óseo neoformado) fueron recuperadas y fijadas con formaldehído por 5 días y desmineralizado con HCl al 5% durante 10 días. Los bloques de hueso desmineralizado fueron incluidos en parafina y los microcortes fueron teñidos con las técnicas de H&E y tricrómico de Masson para estudiar la arquitectura de la neoformación ósea y datos de inflamación.

4.16 Preparación de las muestras y estudios biomecánicos.

A partir de las mandíbulas obtuvimos pequeñas barras del tejido óseo neoformado durante la distracción, las cuales fueron cortadas con disco de diamante y sierra.

Para establecer la calidad del hueso neoformado por el proceso de distracción mandibular se incorporaron dos pruebas biomecánicas:

1.-*Prueba de resistencia por punto de inflexión* en una prueba estándar de

reómetro. Para este efecto se acondicionó un dispositivo y un punzón en el cual se colocaron las barras para medir el *momentum* en el cual la pieza de hueso fue fracturada al aplicar la máxima flexión (Figura 7).

La flexión se calculó siguiendo la siguiente expresión: $\sigma_{max} = Mc/I$

σ_{max} : esfuerzo máximo a la flexión.

M : momento de flexión del segmento rectangular

c : distancia media o espesor de muestra

I : momento de inercia para una sección rectangular

calculada como; $I = ba^3/12$ (b = base, a = altura)

2.-*Prueba de microdureza de Vickers* con punta de diamante. Para esta prueba la preparación de las barras se realizó de acuerdo a la metodología utilizada por Richard H. C. y colaboradores que es utilizada para medir huesos corticales en aves. Esta consistió en la limpieza de las muestras con ultrasonido y solución de cloroformo etanol (solución de 2:1). Posteriormente las muestras fueron montadas en una resina epóxica, (previamente fueron pulidas con lijas hasta el número 1200) y finalmente, en paño con alúmina de 0.1 micrómetros. Finalmente las muestras fueron sometidas al microdurómetro de Vickers utilizando una carga de 25 g durante 15 segundos plasmando huellas de indentaciones las cuales fueron medidas al microscopio óptico para obtener los valores de dureza con la expresión de microdureza de Vickers que es igual a la constante de $VHN = 1854P/d^2$. (Figura 8).

Estas pruebas mecánicas se realizaron en el Laboratorio de Biomecánica y Resistencia de Materiales de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica de la UANL.

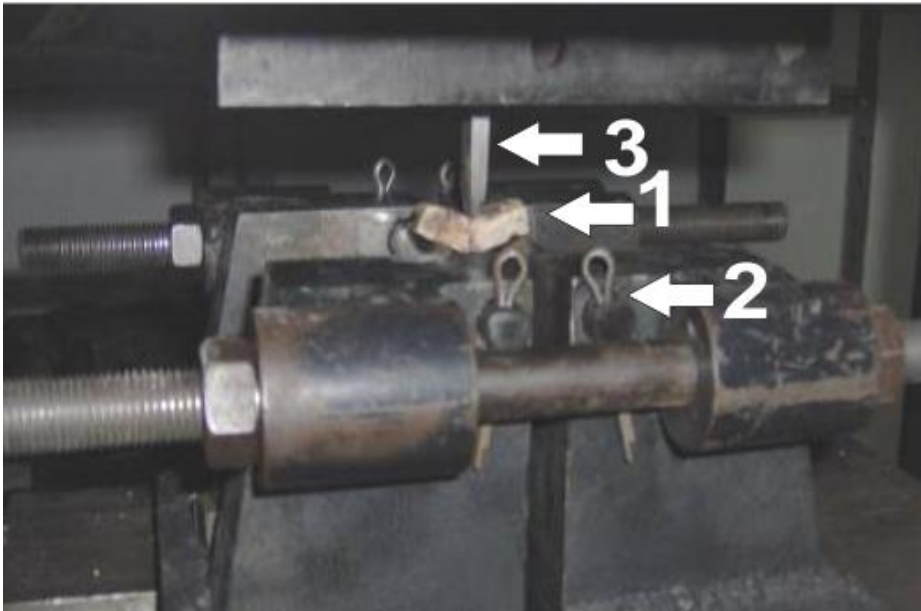


Figura 7. Prueba de resistencia por punto de inflexión.
Se midió el *momentum* en al cual la pieza fue fracturada al aplicar la máxima flexión.

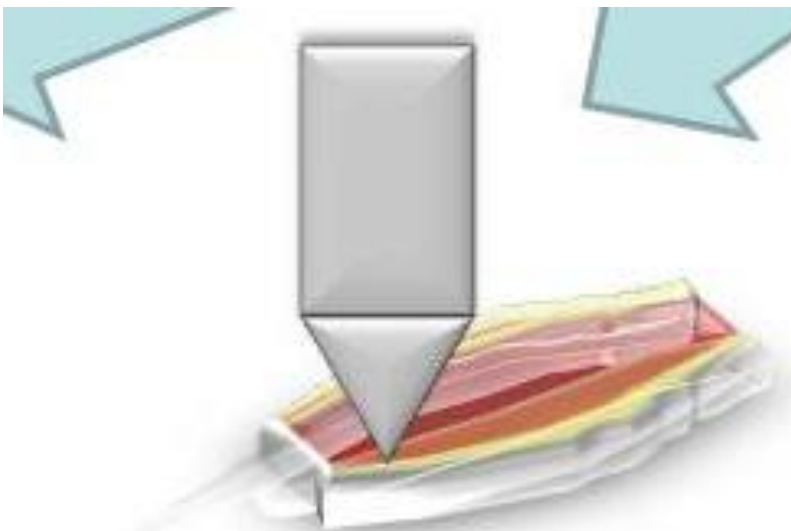


Figura 8. Prueba de Vickers con punta de diamante.
Se realizaron indentaciones y el nivel de profundidad se correlacionó con el grado de dureza.

4.17 Análisis estadístico.

Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos fueron analizados en el paquete de estadística SPSS v 13.0 (SPSS-UK Ltd, St. Andrews House, UK).

Se realizaron pruebas de Student pareada y ANOVA de una vía con análisis de Dunnet. Se consideró un valor de $P \leq 0.05$ para considerar significancia. Los datos se representaron como media \pm desviación estándar para réplicas independientes.

CAPÍTULO V

5. RESULTADOS.

5.1 Tipificación viral

La región quimérica amplificada fue de 1.8 Kb y fue clonada exitosamente. El análisis hecho en el *Gene Bank* mostró homología hacia el promotor de citomegalovirus (CMV) y hacia la BMP2 humana como se muestra a continuación:

gi|59800|emb|X03922.1|HEHCMVP1 Human cytomegalovirus (HCMV) IE1 gene promoter region.

```

Score = 476 bits (240), Expect = 2e-131
Identities = 240/240 (100%), Gaps = 0/240 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 2   CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATT 61
          |||
Sbjct 620  CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATT 679

Query 62   GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCA 121
          |||
Sbjct 680  GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCA 739

Query 122  ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC 181
          |||
Sbjct 740  ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC 799

Query 182  AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTA 241
          |||
Sbjct 800  AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTA 859
    
```

[gi|46812656|gb|BC069214.1](#)|Homo sapiens bone morphogenetic protein 2, mRNA (cDNA clone IMAGE:6303163), partial cds

```

-
Score = 628 bits (317), Expect = 3e-177
Identities = 335/341 (98%), Gaps = 0/341 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 CTCCACAACCATGTCCTGATAGTTCTTTAATACAACCTTTCCATTCTCGTCAAGGAACAG 60
      |||
Sbjct 1958 CTCCACAACCATGTCCTGATAGTTCTTTAATACAACCTTTCCATTCTCGTCAAGGTACAG 1899

Query 61 CATCGAGATAGCACTGAGTTCTGTCTGGGACACAGCATGCCTTAGGAATCTTAGAGTTAAC 120
      |||
Sbjct 1898 CATCGAGATAGCACTGAGTTCTGTCTGGGACACAGCATGCCTTAGGAATCTTAGAGTTAAC 1839

Query 121 AGAGTTGACCAACGCTCTGAACAATGGCATGATTAGTGGAGTTCAGATGATCAGCCAGAGG 180
      |||
Sbjct 1838 AGAGTTGACCAACGCTCTGAACAATGGCATGATTAGTGGAGTTCAGATGATCAGCCAGAGG 1779

Query 181 AAAAGGGCATTCTCCGTGGCAGTAAAAGGCGTGATACCCGGGGAGCCACAATCCAGTC 240
      |||
Sbjct 1778 AAAAGGGCATTCTCCGTGGCAGTAAAAGGCGTGATACCCGGGGAGCCACAATCCAGTC 1719

Query 241 ATTCTTTCCACGTCAGTGAAGTCCACGTACAAAGGGTGTCTCTTACAGCTGGACTTAAG 300
      |||
Sbjct 1718 ATTCCACCCACGTCAGTGAAGTCCACGTACAAAGGGTGTCTCTTACAGCTGGACTTAAG 1659

Query 301 GCGTTTCCGCTGTTTGTGTTTGGCTTGACGTTTTTCTCTTT 341
      |||
Sbjct 1658 GCGTTTCCGCTGTTTGTGTTTGGCTTGACGTTTTTCTCTTT 1618
    
```

5.2 Actividad biológica *in vitro* de la hBMP-2 transducida en CMM caninas.

La expresión de ALP se incrementó tanto en las CMM transducidas con Ad-BMP-2 y las CMM estimuladas con dexametasona (control positivo). En todos los casos el pico máximo de expresión apareció a las 48 h (Figura 9 A). En el caso de las CMM transducidas con Ad-BMP-2 a 1×10^4 MOI, la expresión de ALP fue 44% más elevada que el control positivo ($P < 0.001$), por otro lado, las CMM transducidas con el vector Ad- β -gal no cambió en ningún caso los niveles de expresión respecto de la expresión basal. El análisis de Western blot corroboró la expresión de la hBMP-2 restringida a las CMM transducidas con el Ad-BMP-2 y con la proteína recombinante control (Figura 9 B). En el caso de la

expresión de colágeno tipo 1 canino no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 9 C).

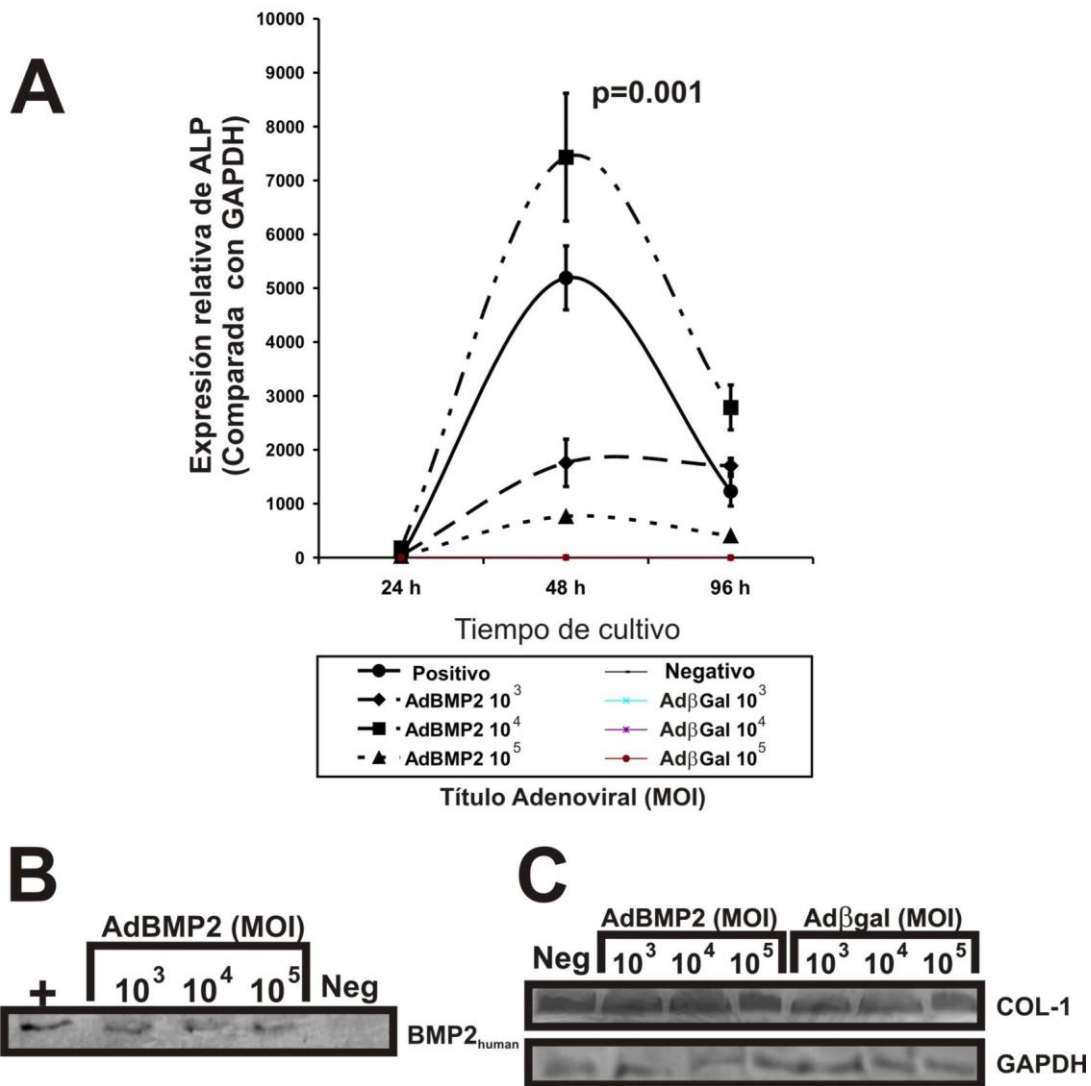


Figura 9. Actividad biológica de la hBMP-2 en CMM caninas

A. La actividad transcripcional del gen ALP (un blanco de la BMP2) en CMM en cultivo muestra un pico a las 48 h post-transducción con diferentes dosis del vector Ad-BMP-2. La transducción con una MOI = 1x100 fue la que mostró la actividad más alta y fue significativamente más elevada que el control positivo (p= 0.001). B. El Western blot, realizado 96 h postransducción para detección BMP2 humana, demostró la presencia de esta proteína en las células caninas transducidas con el Ad-BMP-2, sin diferencia significativa con control positivo C. El Western blot para el colágeno tipo 1 canino sugiere un pequeño incremento en la producción de la proteína en CMM transducidas cuando se compara con el control de GAPDH.

5.3 Seguimiento radiográfico del proceso de consolidación.

Los controles del seguimiento radiográfico demostraron que alrededor de la sexta semana hubo una completa consolidación en el grupo al que se le aplicó el implante-3C. El grupo al que se le aplicó el implante-2C demostró que a las 6 semanas el proceso de consolidación fue menor con respecto al grupo al que se le aplicó el implante-3C, pero mejor que el grupo control. Como mencionamos, el grupo control a la sexta semana evidenció un proceso de consolidación menor con respecto al grupo del implante-2C y al igual que este a las 10 semanas también fue incompleto. Los resultados aportados por el grupo control fueron sumamente importantes, pues mostraron categóricamente las diferencias existentes entre los diferentes grupos. Sin lugar a duda, estos resultados indican que la consolidación para las mandíbulas tratadas con el implante-3C ocurrió aproximadamente en la mitad del tiempo promedio (Figura 10).

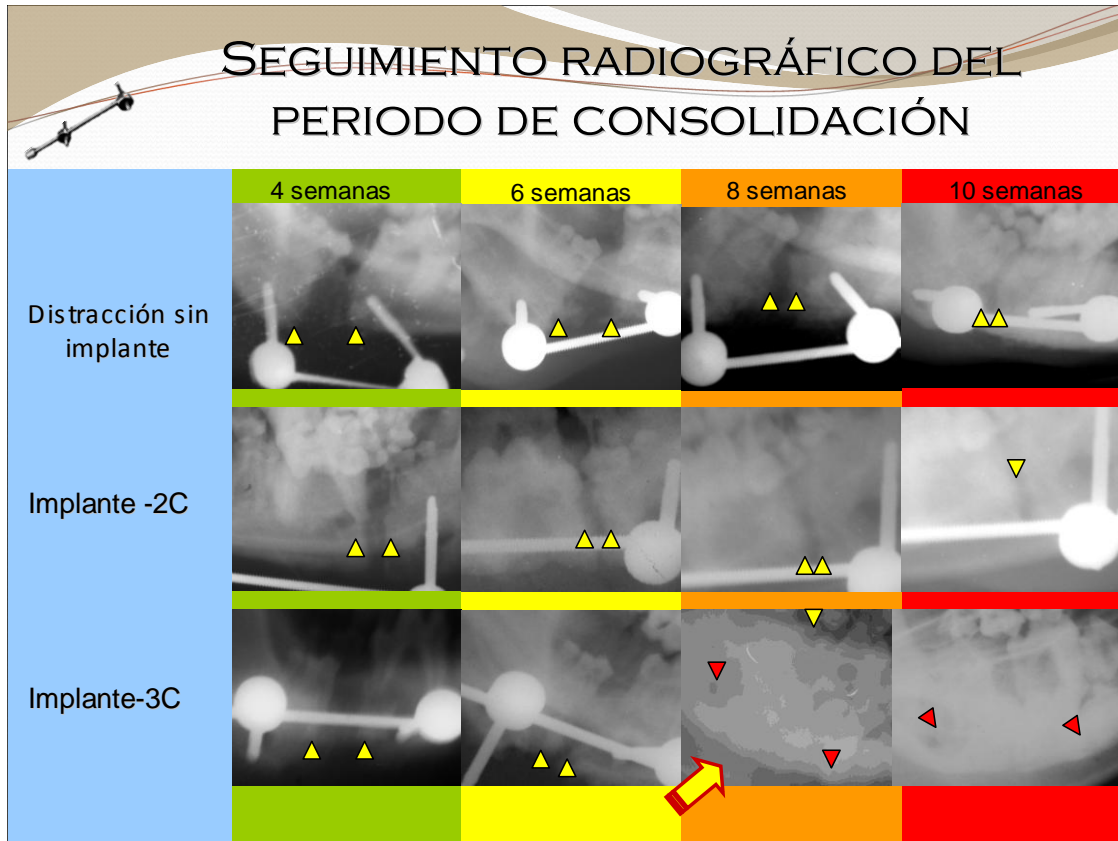


Figura 10. Seguimiento radiográfico a las 2, 4, 6 y 8 semanas del proceso de consolidación.

Los triángulos amarillos marcan el progreso del espacio generado por la distracción. Mientras que los triángulos rojos muestran que a partir de las 6 semanas se obtuvo una consolidación completa en el grupo al que se le aplicó el implante-3C.

5.4 Aspecto macroscópico a las 10 semanas de consolidación.

El análisis macroscópico de las mandíbulas obtenidas del grupo con el implante-3C a las 10 semanas postdistracción mostró en el área de tejido neoformado un hueso con aspecto y dureza casi normal, se encontró escaso tejido fibroso el cual fue removido con facilidad. En las mandíbulas que recibieron el implante-2C se observó un callo fibroso denso, firmemente adherido a la zona del tejido óseo neoformado y que sobrepasaba los límites del espacio logrado por la distracción. En cuanto al grupo control, las mandíbulas mostraron una visualización macroscópica del tejido óseo neoformado con evidencia de consolidación incompleta, el callo fibroso en ese grupo fue menor y de aspecto contraído, estas características corresponden a un aspecto normal de la evolución en un proceso de distracción convencional (Figura 11).

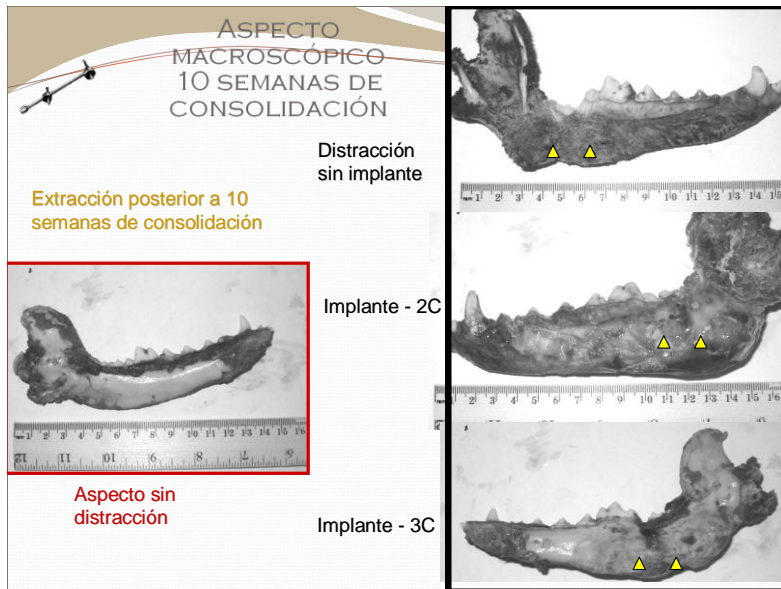


Figura 11. Aspectos macroscópicos a las 10 semanas del periodo de consolidación.

Aspecto macroscópico normal de hemimandíbula (Izq.) Aspecto macroscópico del grupo control y de los grupos que recibieron implante -C2 y 3C.

5.5 Análisis histológico a las 10 semanas de consolidación.

El análisis de la tinción de H&E para las áreas de tejido neoformado mostró una completa regeneración de hueso maduro para las mandíbulas tratadas con el implante-3C. El tejido neoformado incluyó periostio, hueso laminar y como un aspecto relevante, hueso esponjoso. En las mandíbulas que recibieron el implante con CMM no transducidas (implante -2C) se observaron extensas áreas de tejido fibroso, además de abundantes núcleos dispersos de actividad osteoblástica. Finalmente, las mandíbulas que no recibieron implante (grupo control) mostraron lesiones regenerativas caracterizadas por extensas áreas de actividad osteoblástica y pocas zonas de hueso trabecular. La tinción tricrómica de Masson confirmó la presencia de hueso trabecular y médula ósea en el hueso neoformado en aquellas mandíbulas que recibieron el implante-3C, áreas de actividad osteoblástica difusa en los que no recibieron implante y núcleos de neoformación ósea en las mandíbulas tratadas con el implante de CMM sin transducción (Figura 12).

Comparación sistemática de los tres aspectos estudiados (Figura 13)

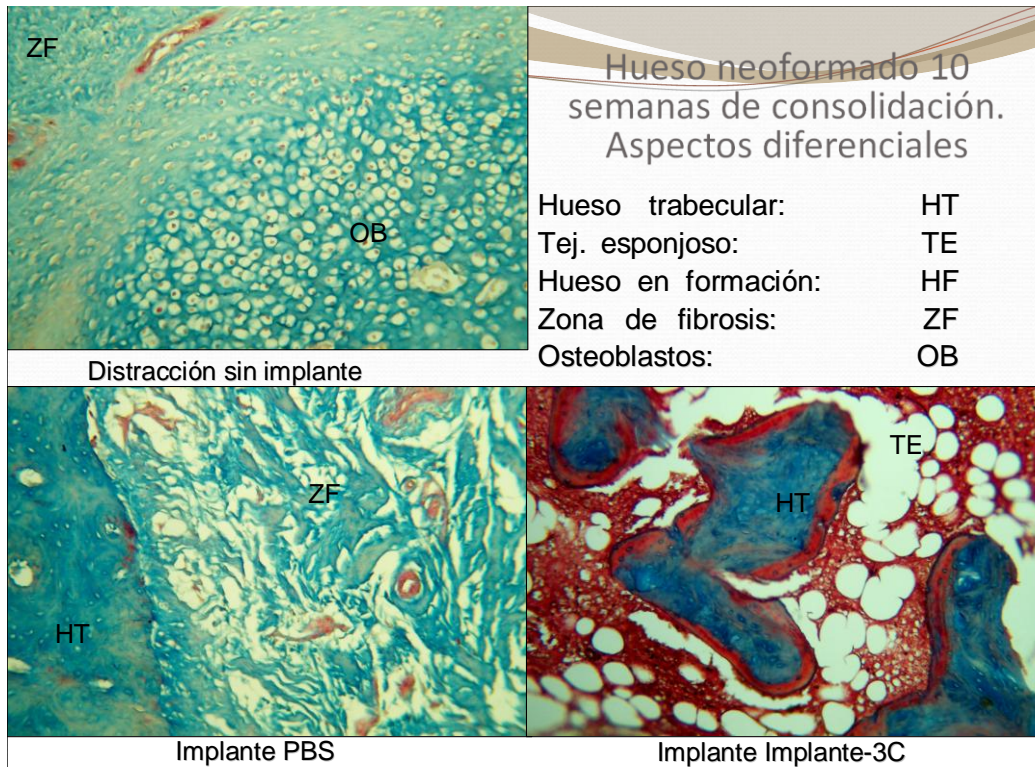


Figura 12. Microfotografías del hueso neoformado (tinción tricrómica de Masson).

Las mandíbulas sin implante muestran amplias zonas inmaduras con actividad osteoblástica, las mandíbulas con el implante de CMM no transducidas evidenciaron abundante tejido fibrótico intercalado con hueso maduro y núcleos de osificación. El implante-3C demostró mejorar la osificación y maduración hacia diferentes estructuras (hueso trabecular y esponjoso), así como presentar mucho menos fibrosis. No hay evidencia de infiltrado inflamatorio en el hueso tratado con el implante-3C.

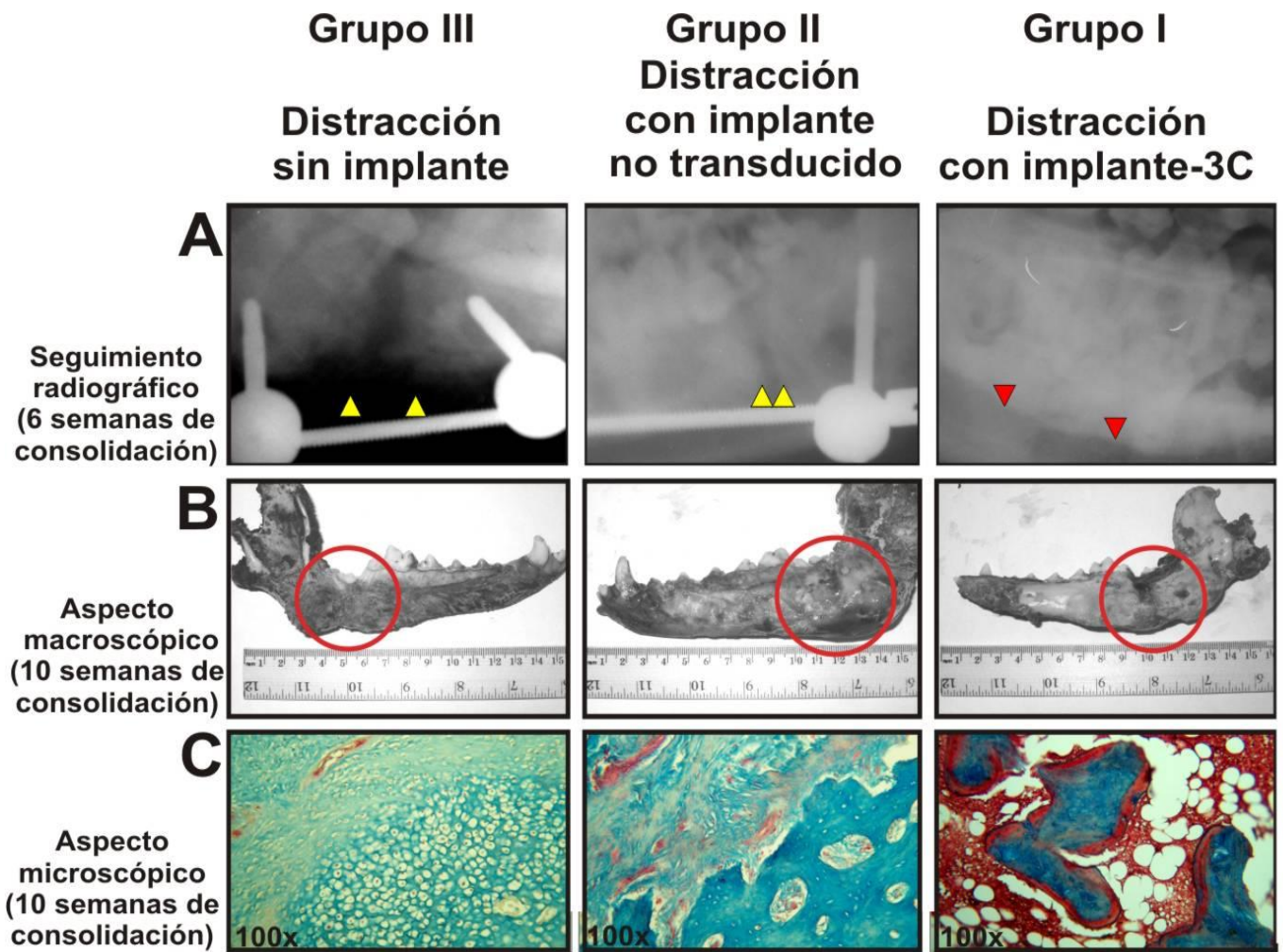


Figura 13. Comparación del seguimiento radiográfico, aspecto macroscópico y microscópico a las 10 semanas de consolidación.

A. Seguimiento radiográfico a las 6 semanas de consolidación. Los triángulos amarillos marcan el progreso de la consolidación en las mandíbulas control, mientras que los triángulos rojos muestran los bordes de la osteotomía en la mandíbula con implante-3C. B. Macroscopía post-mortem (áreas de distracción circuladas en rojo). La mandíbula sin distracción muestra una contracción normal del tejido con una marcada escotadura, la mandíbula con implante de CMM no transducidas desarrolló abundante fibrosis y el hueso que recibió el implante-3C aparece completamente osificado y sin fibrosis. C. Microfotografías del hueso neoformado (tinción tricrómica de Masson). Las mandíbulas sin implante muestran amplias zonas inmaduras con actividad osteoblástica, las mandíbulas con el implante de CMM no transducidas evidenciaron abundante tejido fibrótico intercalado con hueso maduro y núcleos de osificación. El implante-3C demostró mejorar la osificación y maduración hacia diferentes estructuras (hueso trabecular y esponjoso), así como presentar mucho menos fibrosis. No hubo evidencia de infiltrado inflamatorio en el hueso tratado con el implante-3C.

5.6 Pruebas biomecánicas

Prueba de flexión

Ninguno de los grupos alcanzó el grado de resistencia que posee el hueso nativo, lo cual refleja el grado de inmadurez de todos los grupos; sin embargo, hubo una diferencia marcada entre el grupo A (implante-3C) y el grupo C (sin implante), el grupo B (Implante PBS) quedó en un término medio, los resultados se correlacionan con lo observado en los análisis histológicos.

Las fracturas observadas en cada una de las tres barras correspondientes a cada grupo mostraron tener diferencias evidentes, especialmente entre las muestras del grupo I y II con respecto a las del grupo III (figura 14). La fractura tipo visco elástica observada en el grupo III fue casi inmediata, mientras que el grupo I y II mostraron tener mayor resistencia en las fibras del callo que a simple vista mostraron mayor consolidación.

Flexión:

- SD Mandíbulas sanas (sin distracción)
- Grupo I Implante con BMP2
- Grupo II Implante sin vector
- Grupo III Distracción sin implante

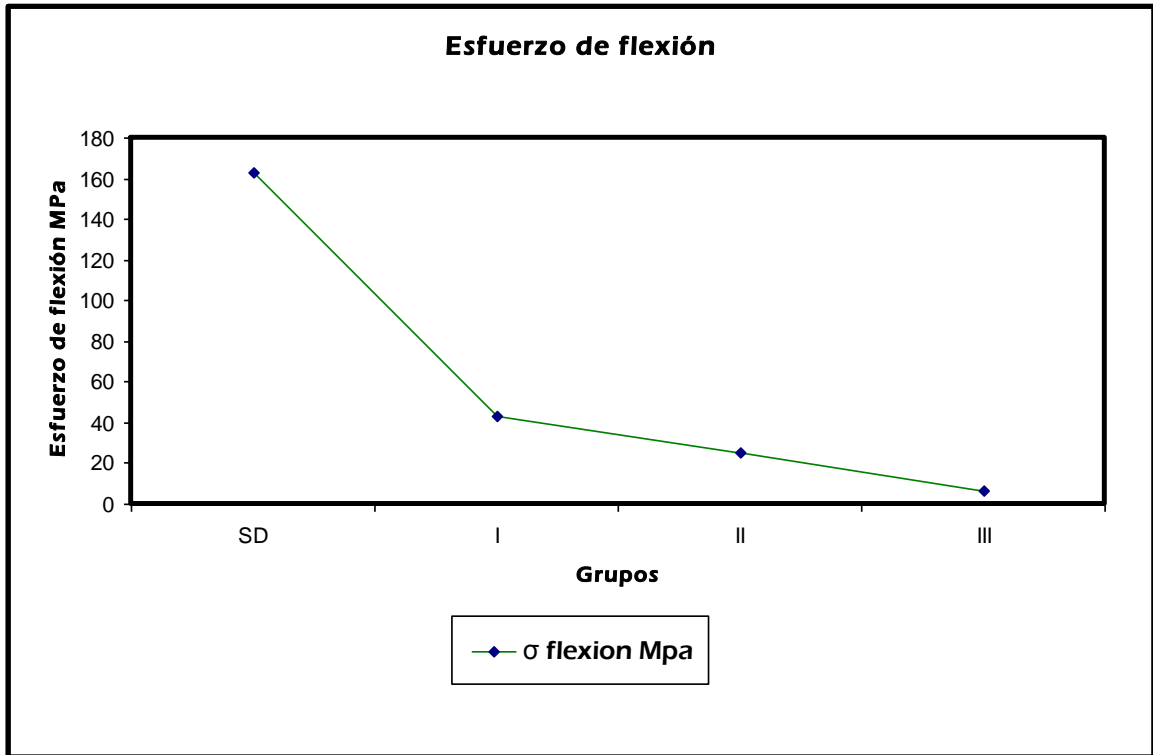


Figura 14. Resultados de la prueba de Flexión.

Prueba de microdureza de Vickers

Los resultados de los análisis de microdureza demostraron una diferencia clara entre el hueso natural y el hueso neoformado. En este caso el control se realizó en hueso cortical sano. Los resultados coinciden con lo reportado en la literatura en que el hueso es muy heterogéneo y siendo éste un análisis muy puntual, no se alcanzaron a observar las diferencias entre cada uno de los grupos en la zona de callo. Esto puede ser atribuido a la heterogeneidad de la zona de fractura donde se realizaron las indentaciones (Figura15).

Se ejemplifican algunas de las morfologías encontradas en la zona de fractura (Figura 16).

Zonas en donde se realizó dureza.	HVN
SD hueso cortical	63.8
Zona de callo Grupo I	45
Grupo II	43
Grupo III	43

Figura 15. Resultados de valores promedio de dureza Vickers HVN.

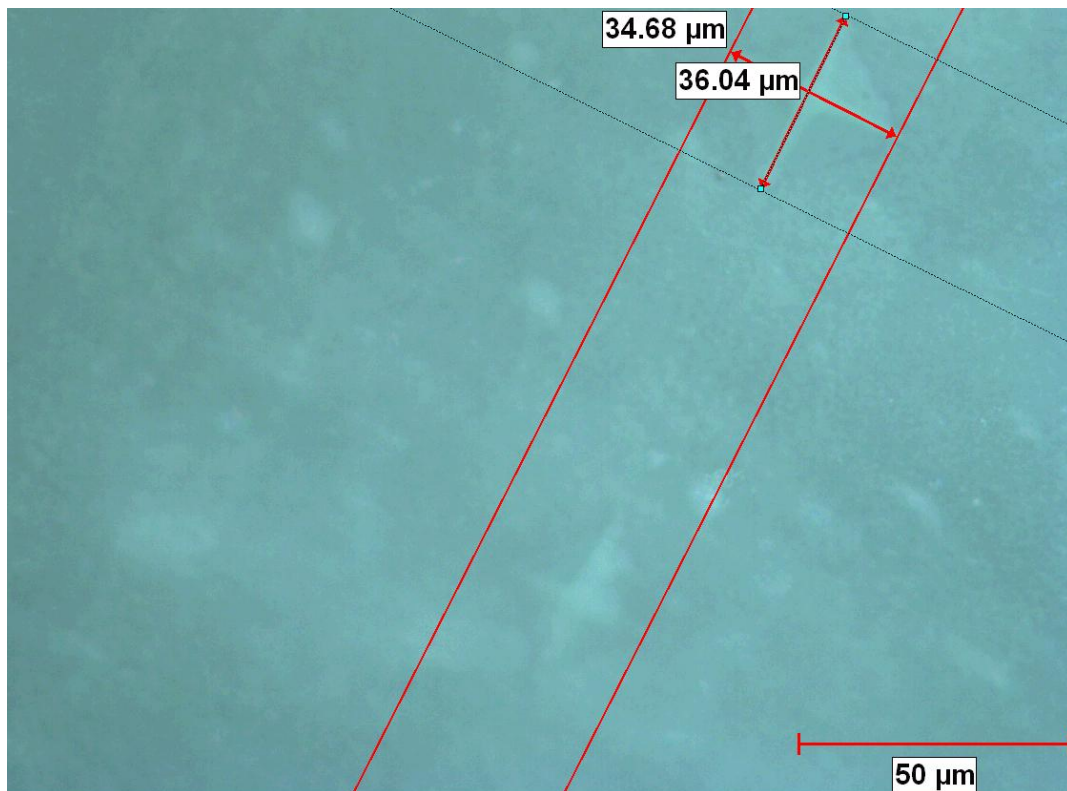


Figura 16. Ejemplo de algunas de las mediciones de huellas, (se realizaron más de 50 mediciones en total correspondientes a las zonas de fractura y de hueso cortical)

5.7 Parámetros para descartar toxicidad hepática.

Los resultados de los análisis de sangre demostraron que no hubo de evidencia de toxicidad hepática o sistémica, particularmente en el grupo en el que se aplicó el implante-3C. Los resultados de laboratorio se encontraron dentro de parámetros normales en todos los grupos tratados durante el estudio experimental (Tabla 2)

Prueba	Preoperatorio	2 semanas postoperatorio
PT (g/dl)	6.63 ± 0.5	6.166 ± 0.23
ALB (g/dl)	2.83 ± 0.57	2.533 ± 0.32
GLOB (g/dl)	3.8 ± 0.55	3.633 ± 0.32
TB (mg/dl)	0.099 ± 1.67x10 ⁻¹⁷	0.099 ± 1.67x10 ⁻¹⁷
AST (UI/L)	33 ± 12.52	24 ± 4.35
ALT (UI/L)	58.33 ± 31.89	43.33 ± 35.72
ALP (UI/L)	60.66 ± 13.27	67.33 ± 38.03
LDH (UI/L)	419.33 ± 40.96	298.66 ± 84
GGT (UI/L)	4.9 ± 3.1	0.1 ± 1.67 × 10 ⁻¹⁷

Tabla 2. Resultados de las pruebas sanguíneas de toxicidad hepática

PT, tiempo de protrombina; ALB, albúmina; GLOB, globulina; TB, bilirrubinas totales (TB); AST, aspartato transaminasa; ALT, alanina transaminasa; ALP, fosfatasa alcalina; LDH, deshidrogenasa láctica; GGT, gamma-glutamil transpeptidasa.

CAPÍTULO VI

6. DISCUSIÓN

En nuestros experimentos *in vitro*, las CMM transducidas con el Ad-BMP-2 a 1×10^4 MOI mostraron el mayor nivel de transcripción de ALP (un blanco transcripcional de la actividad metabólica de la BMP-2) a las 48 h postransducción, mientras que la expresión de colágeno tipo 1 no se vio afectada a las 96 h postransducción. Además observamos un notable aumento en la población en aquellos cultivos tridimensionales de CMM transducidas con el Ad-BMP-2, que a su vez se acompañó por un incremento en la mineralización de la matriz extracelular. Estos resultados sugieren que la actividad osteogénica se pone de manifiesto antes de los 10 días postransducción y esto es consistente con la observación de reportes previos (46, 47, 48).

Existen diversas matrices que han sido utilizadas para la osteoconducción, algunas de las estudiadas, como el alginato de calcio, han demostrado pobres resultados (48). En nuestro estudio utilizamos MHD la cual cumplió función de andamiaje y favoreció a la osteoconducción de manera adecuada. El seguimiento radiográfico mostró que el implante-3C utilizado en distracciones mandibulares reduce la consolidación aproximadamente en la mitad del tiempo en relación al periodo normal. Al término del trabajo experimental, encontramos que a las 10 semanas el hueso reconstruido por el implante-3C tiene características macroscópicas y microscópicas de hueso maduro normal. Los resultados encontrados en las mandíbulas que recibieron el implante con CMM sin transducción fueron superiores con respecto al grupo control en el mismo periodo de tiempo y evidentemente ambos resultados fueron superados grandemente por el grupo del implante-3C. En otro aspecto, la extensa fibrosis

producida por el implante de CMM y MHD demuestra que aunque existe osteoinducción, esta fibrosis mayor puede obstaculizar la osteoconducción, por lo que creemos necesario la participación de la hBMP2 para conducir mejor la remodelación.

Algunos factores explorados en nuestro modelo canino proporcionan argumentos a favor del uso del implante-3C en mamíferos mayores. Este modelo utiliza animales inmunocompetentes con amplia heterogeneidad genética y sin crianza especial para laboratorio, lo cual supone siempre un reto a vencer para los modelos de investigación preclínica.

Ross D. *et al.* reportaron recientemente los efectos de la tasa de distracción en un modelo mandibular de bovino para observar los aspectos biomecánicos e histológicos, en este trabajo se concluyó que el grupo al que se le realizó distracción a razón de 1 mm por día probó ser biomecánicamente superior (50). Nuestros resultados son apoyados por este estudio, pues ambos fueron realizados en mamíferos mayores utilizando un índice de distracción de 1 mm por día, probablemente en aplicaciones clínicas para tasas más rápidas de distracción se requieran más estudios en los periodos de latencia y fijación. Paccione MF *et al.* estudiaron la respuesta de adaptación con base en la latencia, índice y ritmo en la distracción osteogénica en mandíbula de ratas. Ellos concluyeron que índices de distracción de 0.50 mm por día estimulan excelentemente la regeneración ósea, mientras que índices más grandes de distracción produjeron una unión fibrosa (51). No existe uniformidad en los criterios para establecer los parámetros ideales de la distracción osteogénica, sin embargo los reportes apuntan que índices de distracción de 1 mm por día estimulan mejor la regeneración ósea. Es importante considerar que los huesos

del esqueleto craneofacial y huesos largos tienen aspectos estructurales y cargas biomecánicas diferentes. El área tratada está sujeta constantemente a fuerzas biomecánicas diversas y tensiones propias de un animal carnívoro y que al ser la primera porción del aparato digestivo es una zona con una gran actividad inmunológica.

A. Scharz *et al.* analizaron las propiedades biomecánicas de la mandíbula después de distracción osteogénica utilizando ratas como modelo experimental. El periodo de latencia fue de 4 días y el periodo de consolidación de 4 semanas, concluyeron que hubo significativa menor resistencia a la fractura por carga y a la prueba de microdureza en un 40 y 60% respectivamente (52). Hasta hace poco tiempo se han empezado a entender los aspectos biomecánicos de la regeneración ósea post-distracción mandibular en mamíferos mayores, pues solo existen escasos reportes de las propiedades biomecánicas en mamíferos pequeños. No existen reportes de los aspectos biomecánicos en distracción osteogénica mandibular acelerada con terapia génica en mamíferos mayores.

Los resultados de los análisis de sangre demostraron que no hubo evidencia de toxicidad hepática o sistémica, particularmente en el grupo en el que se aplicó el implante -3C y estos fueron correlacionados con el análisis histológico donde no encontramos evidencia de una reacción inflamatoria persistente o actividad linfocítica en la zona de implantación. En este sentido, la hipótesis es que la baja respuesta inmune en nuestro modelo se debe tanto a no haber inoculado el vector o la proteína recombinante directamente en el sitio de la lesión, como por el procedimiento de lavado durante la construcción del implante con la finalidad de eliminar el exceso de vectores no replicantes (49). Por otro lado el

uso de CMM autólogas previenen en gran medida el rechazo del implante. Finalmente, las pruebas de laboratorio antes y después de la colocación del implante también demuestran la seguridad que ofrece la terapia génica adenoviral *ex vivo* que sin duda constituyó un gran argumento para su uso.

CAPÍTULO VII

7. CONCLUSIONES

Las pruebas *in vitro* e *in vivo* han demostrado la factibilidad de la regeneración de hueso normal utilizando el implante-3C en perro (modelo de mamífero mayor), reduciendo el periodo de consolidación en aproximadamente la mitad del tiempo (6 semanas). El implante-3C acelera la consolidación ósea, restaura la arquitectura del hueso normal (comparado con los grupos que recibieron el implante de CMM sin transducir y de los que no recibieron implante) y no induce una respuesta inflamatoria importante en el área tratada. Estos experimentos también demuestran que el modelo terapéutico es seguro y que nos permite acercarnos a futuros ensayos clínicos. Esta efectividad y seguridad probablemente radica en la terapia *ex vivo* y del lavado del exceso de virus durante la construcción del implante, lo cual reduce la presentación del vector ante el sistema inmune.

Los resultados de las pruebas de flexión demostraron que si bien es cierto que ninguno de los grupos de estudio alcanzó el grado de resistencia que tiene el hueso nativo, hubo una diferencia marcada entre el grupo del implante-3C y el grupo del implante-2C y el control, lo cual se correlacionó objetivamente con los resultados encontrados en el análisis histológico. De forma similar los resultados de las pruebas de microdureza demostraron que ninguno de los grupos de estudio alcanzó el grado de dureza del hueso nativo. La diferencia entre el grupo del implante-3C y el grupo del implante-2C y control fue de dos puntos en los valores de expresión de microdureza de Vickers. Estos resultados reflejan que las pruebas biomecánicas de la flexión y resistencia fueron superiores en el grupo del I-3C, sin embargo es importante resaltar que en condiciones normales después de una fractura las propiedades

biomecánicas del hueso reparado contra el hueso nativo son similares al cabo de varios meses.

Es importante mencionar que en el aspecto clínico el hecho de poder acelerar el proceso de distracción osteogénica mandibular con terapia génica acorta la etapa de consolidación y como consecuencia el tiempo de portación de los distractores.

Finalmente podemos concluir con base en los resultados aportados por este trabajo experimental de distracción osteogénica mandibular acelerado por terapia génica de BMPs, que este estudio puede contribuir a entender mejor el análisis futuro de la expresión génica durante la distracción osteogénica en mandíbulas de mamíferos grandes, facilitando el desarrollo de mejores estrategias biológicas diseñadas para incrementar la regeneración del hueso formado. El hecho objetivo de acelerar el periodo de consolidación hasta en la mitad del tiempo promedio y el estudio de los aspectos biomecánicos, pueden dar la pauta para posteriores investigaciones en la regeneración ósea mandibular particularmente cuando es acelerada con terapia génica, aunado a las condiciones que permitan en un futuro su incorporación a la parte clínica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ORTIZ MONASTERIO F, MOLINA F, ANDRADE L, RODRIGUEZ C, SAINZ ARREGUI J. Simultaneous mandibular and maxillary distraction in hemifacial microsomia in adults: Avoiding occlusal disasters. *Plast Reconstr Surg.* 1997 Sep;100(4):852-61.
2. CASTRO-GOVEA Y, FUENTE DEL CAMPO A, CHACÓN-MARTÍNEZ H, PÉREZ-PORRAS S, GARCÍA-PÉREZ M, CANTÚ-SÁNCHEZ M. Distracción osteogénica. Un excelente recurso en el tratamiento de la hipoplasia máximo-mandibular. *Rev. Medicina Universitaria.* 2004; 6: 16-22.
3. ILIZAROV G. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop Relat Res.* 1989 Jan; (238):249-81.
4. ILIZAROV G. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop Relat Res.* 1989 Feb;(239):263-85.
5. ILIZAROV G, DEVYATOV AA, KAMERIN VK. Plastic reconstruction of longitudinal bone defects by means of compression and subsequent distraction. *Acta Chir Plast.* 1980;22(1):32-41.
6. PANIKAROVSKII VV, ERMOLAEV II, GRIGOR'IAN AS, KOROBĚŇNIKOVA GM. Experimental mandibular regrowth by distraction osteogenesis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993;119:511-6.
7. KARP N. Membranous bone lengthening. A serial histologic study. *Plast. Surgical Forum.* 1990; 13:113-118.
8. SNYDER CC, LEVINE GA, SWANSON HM, BROWNE EZ JR. Mandibular lengthening by gradual distraction. Preliminary report. *Plast Reconstr Surg.* 1973

May;51(5):506-8.

9. MICHIELI S, MIOTTI B. Lengthening of mandibular body by gradual surgical orthodontic distraction. J Oral Surg. 1977 Mar;35(3):187-92.

10. MCCARTHY JG, SCHREIBER J, KARP N, THORNE CH, GRAYSON BH. Lengthening the human mandible by gradual distraction. Plast Reconstr Surg. 1992 Jan;89(1):1-8; discussion 9-10.

11. COPE, JB, SAMCHUKOV, ML, CHERKASHIN, AM. Mandibular distraction osteogenesis: a historic perspective and future directions. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1999 Apr;115(4):448-60.

12. ROSENTHAL N. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. N Engl J Med. 2003 Jul 17;349(3):267-74.

13. BLAU HM, BRAZELTON TR, WEIMANN JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? Cell. 2001 Jun 29;105(7):829-41.

14. KANG SW, LEE JS, PARK MS, PARK JH, KIM BS. Enhancement of in vivo bone regeneration efficacy of human mesenchymal stem cells. J Microbiol Biotechnol. 2008 May;18(5):975-82

15. MINGUELL JJ, ERICES A, CONGET P. Mesenchymal Stem Cells. Exp Biol Med (Maywood). 2001 Jun;226(6):507-20.

16. MARIE PJ, FROMIGUÉ O. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. Regen Med. 2006 Jul;1(4):539-48.

17. PELLÉD G, G T, ASLAN H, GAZIT Z, GAZIT D. Mesenchymal stem cells for bone gene therapy and tissue engineering. Curr Pharm Des. 2002;8(21):1917-28.

18. TUAN RS, BOLAND G, TULI R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Res Ther. 2003;5(1):32-45.

19. EINHORN, T.A., MAJESKA, R.J. MOHAIDEEN, A., KAGEL, E.M., BOUXSEIN, M.L., TUREK, T.J., WOZNEY J.M. (2003). A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am.* 85-A, 1425–1435.
20. KHANAL A, YOSHIOKA I, TOMINAGA K, FURUTA N, HABU M, FUKUDA J. The BMP signaling and its Smads in mandibular distraction osteogenesis. *Oral Dis.* 2008 May;14(4):347- 55.
21. HOTZ G, HERR G. Bone substitute with osteoinductive biomaterials-current and future clinical applications. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1994 Dec;23(6 Pt 2):413-7.
22. HAQUE T, HAMADE F, ALAM N, KOTSIOPRIFTIS M, LAUZIER D, ST-ARNAUD R, HAMDY RC. Characterizing the BMP pathway in a wild type mouse model of distraction osteogenesis. *Bone.* 2008 Jun;42(6):1144-53.
23. BOYNE PJ, NATH R, NAKAMURA A. Human recombinant BMP-2 in osseous reconstruction of simulated cleft palate patient. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1998 Apr;36(2):84-90.
24. WOZNEY J. The Potential Role of Bone morphogenetic Proteins in periodontal Reconstruction. *J Periodontol.* 1995 Jun;66(6):506-10.
25. BETZ OB, BETZ VM, NAZARIAN A, EGERMANN M, GERSTENFELD LC, EINHORN TA, VRAHAS MS, BOUXSEIN ML, EVANS CH. Delayed administration of adenoviral IBMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. *Gene Ther.* 2007 Jul;14(13):1039-44.
26. FERRAZ FH, SCHELLINI SA, SCHELLINI RC, PELLIZON CH, HIRAI FE, PADOVANI CR. BMP implant associated with platelet-rich plasma in orbit fracture repair. *Curr Eye Res.* 2008 Mar;33(3):293-301.

27. VOLPERS C, KOCHANNEK S.. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. J Gene Med. 2004 Feb;6 Suppl 1:S164-71.
28. REGAZZONI C, WINTERHALTER KH, ROHRER L.(2001). Type I collagen induces expression of bone morphogenetic protein receptor type II. Biochem Biophys Res Commun. 283.316-322
29. CHEN D, ZHAO M, MUNDY GR. (2004). Bone morphogenetic proteins. Growth Factors. 22. 233-241
30. DELL'ACCIO F, DE BARI C, EL TAWIL NM, BARONE F, MITSIADIS TA, O'DOWD J, PITZALIS C. (2006). Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury.Arthritis Res Ther. 8.139.
31. LI JZ, LI H, SASAKI T, HOLMAN D, BERES B, DUMONT RJ, PITTMAN DD, HANKINS GR, HELM GA. (2003). Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat.Gene Ther. 10.1735-1743.
32. TAKAHASHI S., URIST M.R. (1986). Differentiation of cartilage on three substrata under the influence of an aggregate of morphogenetic protein and other bone tissue noncollagenous proteins (BMP/iNCP). Clin Orthop Relat Res. 207. 227-238.
33. CHENG, H., JIANG, W., PHILLIPS, F.M., HAYDON, R.C., PEND, Y., ZHOU, L., LUU, H.H., AN, N., BREYER, B., VANICHAKARN, P., SZATKOWSKY, J.P., PARK, J.Y., HE, T.C. (2003). Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). J Bone Joint Surg Am. 85-A, 1544–1552
34. GOVENDER, S., CSIM MA, C., GENANT, H.K., VALENTIN-OPRAN, A., AMIT, Y., ARBEL, R., ARO,

H., ATAR, D., BISHAY, M., BÖRNER, M.G., CHIRON, P., CHOONG, P., CINATS, J., COURTENAY, B., FEIBEL, R., GEULETTE, B., GRAVEL, C., HAAS, N., RASCHKE, M., HAMMACHER, E., VAN DER VELDE, D., HARDY, P., HOLT, M., JOSTEN, C., KETTERL, R.L., LINDEQUE, B., LOB, G., MATHEVON, H., MCCOY, G., MARSH, D., MILLER, R., MUNTING, E., OEVRE, S., NORDSLETTEN, L., PATEL, A., POHL, A., RENNIE, W., REYNDERS, P., ROMMENS, P.M., RONDIA, J., ROSSOUW, W.C., DANEEL, P.J., RUFF, S., RÜTER, A., SANTAVIRTA, S., SCHILDHAUER, T.A., GEKLE, C., SCHNETTLER, R., SEGAL, D., SEILER, H., SNOWDOWNE, R.B., STAPERT, J., TAGLANG, G., VERDONK, R., VOGELS, L., WECKBACH, A., WENTZENSEN, A., WISNIEWSKI, T. (2002). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J. Bone Joint Surg Am.* 84-A, 2123–2134.

35. VALENTIN-OPRAN, A., WOZNEY, J., CSIMMA, C., LILLY, L., RIEDEL, G.E. (2002). Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res.* 395, 110–120.

36. Abu-Serriah M, Kontaxis A, Ayoub A, Harrison J, Odell E, Barbenel J. Mechanical evaluation of mandibular defects reconstructed using osteogenic protein-1 (rhOP-1) in a sheep model: a critical analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005 May;34(3):287-93.

37. Nyman JS, Reyes M, Wang X. Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. *Micron.* 2005;36(7-8):566-82.

38. BALTZER, A.W., LATTERMANN, C., WHALEN, J.D., WOOLEY, P., WEISS, K., GRIMM, M., GHIVIZZANI S.C., ROBBINS P.D., EVANS C.H.

(2000). Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther.* 7, 734–739.

39. Chang SC, Chuang HL, Chen YR, Chen JK, Chung HY, Lu YL, Lin HY, Tai CL, Lou J. (2003). Ex vivo gene therapy in autologous bone marrow stromal stem cells for tissue-engineered maxillofacial bone regeneration. *Gene Ther.* 10. 2013-2019.

40. BLAIR, G.E. (2004). Adenoviral vectors: Adenoviral vectors, breaking a barrier to gene therapy? *Gene Ther.* 11, 229–230.

41. EGERMANN, M., LILL, C. A., GRIESBECK, K., EVANS, C. H., ROBBINS, P. D., SCHNEIDER, E., BALTZER A.W. (2006). Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. *Gene Ther.* 13, 1290–1299. (a)

42.-BONADIO J, CUNNINGHAM ML. Genetic approaches to craniofacial tissue repair. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun;961:48-57.

43. DALL'ARA E, OHMAN C, BALEANI M, VICECONTI M. The effect of tissue condition and applied load on Vickers hardness of human trabecular bone. *J Biomech.* 2007;40(14):3267-70.

44.- RICHARD H. BONSER. Longitudinal variation in mechanical competence of bone along the avian humerus. *The Journal of experimental Biology.* 1995;198:209-212

45. DANIEL, A., SHWARTZ, AAMEN M JAMALI, OREFFO, R.O., COOPER, C., MASON, C., CLEMENTS, M. (2005). Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev.* 1, 169–178.

46. HISHIKAWA, K., MIURA, S., MARUMO, T., YOSHIOKA, H., MORI, Y., TAKATO, T., FUJITA, T. (2004). Gene expression profile of human

mesenchymal stem cells during osteogenesis in three-dimensional thermoreversible gelation polymer. *Biochem Biophys Res Commun.* 317, 1103–1107.

47. LUU, H.H., SONG, W.X., MANNING, D., LUO, J., DENG, Z.L., SHARFF, K. (2007). Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 25, 665-77.

48. ZACHOS, T., DIGGS, A., WEISBRODE, S., BARTLETT, J., BERTONE, A. (2007). Mesenchymal stem cell-mediated gene delivery of bone morphogenetic protein-2 in an articular fracture model. *Mol Ther.* 15, 1543–1550.

49. EGERMANN, M., BALTZER A.W., ADAMASZEK, S., EVANS, C, ROBBINS, P., SCHNEIDER, E., LILL, C.A. (2006). Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. *Hum Gene Ther.* 17, 507-17. (b)

50. ROSS D. FARHADIEH, B.SC.(MED.), MARK P. GIANOUTSOS, M.B.B.S., M.D., F.R.A.C.S., R. DICKINSON, M.B.B.S., F.R.A.C.S., AND WILLIAM R. WALSH, B.SC., PH.D. Effect of distraction rate on biomechanical, mineralization, and histologic properties of an ovine mandible model. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105:889-895.

51. PACCIONE MF, MEHRARA BJ, WARREN SM, GREENWALD JA, SPECTOR JA, LUCHS JS, LONGAKER MT. Rat mandibular distraction osteogenesis: latency, rate, and rhythm determine the adaptive response. *J. Craniofac Surg.* 2001;12:175-182

52. DANIEL A. SCHATZ, KRIKOR G. ARMAN, MEHREEN S. KAKWAN, AMEEN M. JAMALI, STEVENR. BUCHMAN. Analysis of the biomechanical Properties of the mandible after unilateral distraction osteogenesis. *Plast*

Reconst Surg. 2010; 126:533-542