

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

# ACCIÓN DE LA rhBMP-2 EN LA DIFERENCIACIÓN ÓSEA TEMPRANA DEL PROCESO MANDIBULAR

Trabajo de Investigación  
Master en Ciencias odontológicas  
Madrid, 2012-2013

Carlos Díaz López



Madrid 2013

D. José Vicente Sanz Casado, Profesor Titular de Universidad, Director del Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y D. Enrique Martínez Campos, Personal Investigador Post-doctoral asociado a proyecto,

CERTIFICAN que,

El trabajo de investigación titulado: **“Acción de la rhBMP-2 en la diferenciación ósea temprana del proceso mandibular”**

Del que es autor D. Carlos Díaz López, ha sido realizado en este departamento bajo nuestra dirección y supervisión, reuniendo en nuestra opinión todos los requisitos para ser presentado y defendido para superar el curso del Master en Ciencias Odontológicas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid, a 10 de junio de 2013.

Fdo: D. José Vicente Sanz Casado

Fdo: D. Enrique Martínez Campos

# ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSIÓN	33
7. CONCLUSIONES	41
8. BIBLIOGRAFÍA	42

# **INTRODUCCIÓN.**

# 1- INTRODUCCIÓN

## 1.1- Ingeniería de tejidos y regeneración tisular.

Los principios de la ingeniería de tejidos están basados en el reclutamiento dirigido y regulado de células madre mesenquimales, aportando para ello diferentes factores de crecimiento que promueven la proliferación o la diferenciación celular mediante mecanismos quimiotácticos. En las últimas décadas, la odontología y la ingeniería de tejidos han encontrado un campo común de experimentación y desarrollo en el estudio de la regeneración ósea.

La ingeniería de tejido óseo se define como la construcción de tejido óseo nuevo *in vitro* o *in vivo* usando biomateriales, células y factores de crecimiento, solos o en combinación, utilizando los principios básicos de la biología molecular (Crane *et al* , 1995; Jiang *et al* , 2012). El hueso creado mediante ingeniería tisular con cualidades nativas es actualmente necesario para la oseointegración de los implantes dentales. La regeneración tisular por defectos mandibulares causadas por resección tumoral, infecciones, trauma, malformaciones congénitas o deficiencias óseas por la edad, resultan un reto en la medicina oromaxilar (Xia *et al* , 2013). La pérdida de dientes interfiere con la habilidad de masticación, del habla y disminuye la confianza en las interacciones sociales. En última instancia, disminuye la calidad nutricional, física, social y psicosocial en la vida del individuo (Holliste *et al* , 1993; Reisine *et al* , 1995; Weintraub *et al* , 1985).

Actualmente, el injerto óseo autógeno es el tratamiento estándar para la regeneración ósea, pero tiene desventajas importantes que incluyen infección, dolor, pérdida de función y lesión producida en el área donante, limitando su aplicación clínica. Además, el uso de tejido de aloinjerto o de xenoinjerto como un sustituto de hueso autógeno, puede ser limitado por las complicaciones tales como la transmisión de enfermedades, la respuesta inmunogénica y la oferta limitada (Greenwald *et al* , 2001; Ito *et al* , 2006; Zhao *et al* , 2009). Afortunadamente, con el desarrollo de la investigación en células madre y el estudio de nuevos biomateriales, la ingeniería tisular ósea podría ser desarrollada como una alternativa para lograr mejores resultados en la regeneración ósea oral y maxilofacial.

Utilizando como modelo el embrión de pollo, en este Trabajo Final de Máster se va a analizar desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos el efecto que tiene la BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*; proteína morfogenética de hueso) en la diferenciación ósea de los mamelones maxilar y mandibular.

## 1.2- Principios moleculares de actuación de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP's) en las primeras etapas de la formación de hueso

Las BMPs son proteínas de la superfamilia de factores de crecimiento TGF- $\beta$  (Wozney 1992). Estas moléculas son elementos clave en la regulación del crecimiento y

diferenciación celular, dirigiendo la formación tisular en el desarrollo y maduración de los organismos.

Además, la familia de proteínas BMP interviene también en numerosos procesos y mecanismos biológicos en organismos adultos. En las últimas décadas, ha sido posible describir su papel en la formación de hueso o cartílago, diferenciación de tejido cardíaco o neural, viabilidad o mediador de interacción celular. (Wozney *et al* , 1989, 1998, 1990; Schaub *et al* , 1991; Zhou *et al* , 1993; Wang *et al* , 1993)

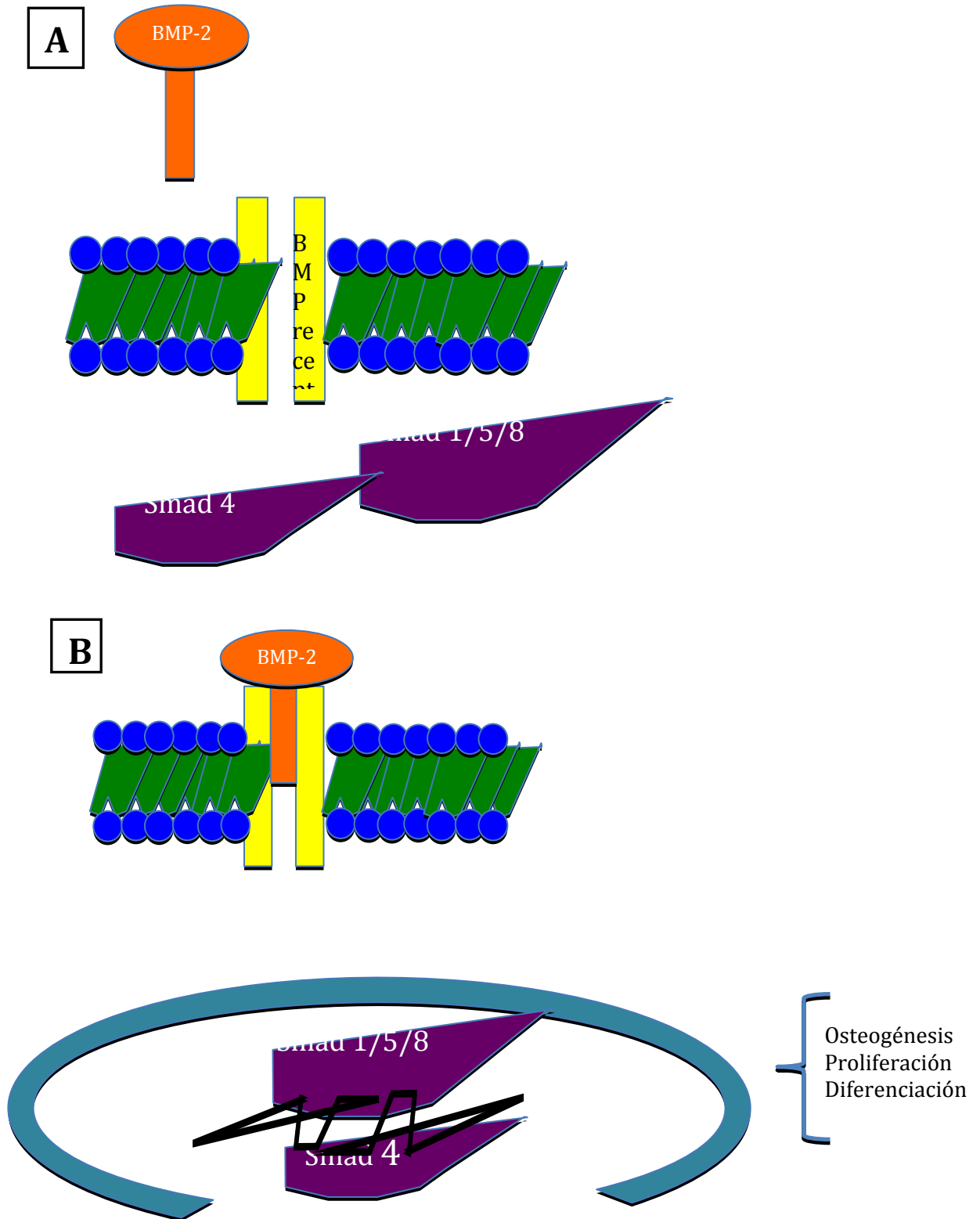
Las BMPs son sintetizadas dentro de las células como pre-proteínas con uniones N-glicosiladas, un péptido líder secretor hidrofóbico, y una secuencia de pro-péptidos unida a la región madura. Esta proteína madura forma dímeros con otros monómeros de BMP.

Las BMPs expuestas o secretadas a una herida contribuyen mediante quimiotaxis a la acumulación de células madre mesenquimales (MSC), responsables del proceso de formación de tejido nuevo. Sin embargo, se ha visto que esta molécula no es la única implicada en la regeneración tisular. Como ejemplo, el factor PDG- $\beta$ , secretado también por los macrófagos, tiene mayor potencia quimiotáctica y efecto proliferativo sobre las MSCs. (Cunningham *et al* , 1992). Las fuentes de MSCs son la médula ósea, el periostio, los pericitos y las MSC circulantes. La BMP-2 regula a las MSC's en la diferenciación a osteoblastos para el desarrollo de hueso intramembranoso o, por otro lado, actúa sobre los condrocitos para el desarrollo de cartílago y remodelación para la formación endocondral de hueso.

Las actividades osteoinductivas de las BMPs en las MSCs se realizan a través de receptores transmembrana de tipo serina/treonina kinasa. La BMP-2 interacciona con los receptores tipo I (BMPRI1A) y con los receptores tipo II (BMPRII). La unión de los dímeros de BMP-2 a los receptores de tipo I y II da como resultado la activación de otras moléculas de señalización intracitoplasmática (Fig. 1).

Las proteínas Smad juegan un papel secundario crítico en la transducción de las señales de BMP a los genes objetivos en el núcleo celular. De este modo, los complejos Smad activos son translocados al núcleo para interactuar con los factores de transcripción necesarios para mediar la activación del gen objetivo. Entre ellos, Runx-2 es el factor esencial de transcripción para la respuesta génica de las BMPs, e inicia la diferenciación osteoblástica. (Chiu-Jou *et al* , 2008). La expresión de Runx-2 también regula la expresión de los genes que sintetizan las proteínas de la matriz extracelular ósea, sialoproteína, osteocalcina y colágeno tipo I.

Por ello, este factor podría ser una importante diana de acontecimientos celulares, tales como la adhesión de la matriz extracelular, los cambios en la forma celular y las respuestas a estrés.



**Figura 1.** La BMP-2 interacciona con los receptores tipo I (BMPRI1A) y con los receptores tipo II (BMPRI2). La unión de los dímeros de BMP-2 a los receptores de tipo I y II da como resultado la activación de otras moléculas de señalización intracitoplasmática Smad (A). Las proteínas Smad juegan un papel secundario crítico en la transducción de las señales de BMP a los genes objetivos en el núcleo celular. De este modo, los complejos Smad activos son translocados al núcleo para interactuar con los factores de transcripción necesarios para mediar la activación del gen objetivo (B).

Un proceso clave en la formación de hueso es la vascularización, la cual se observa en la transición de preosteoblastos a osteoblastos durante el desarrollo y la curación por fractura. Dentro de este proceso, las BMPs inducen también la expresión y secreción de factores de crecimiento vasculares endoteliales  $\alpha$  (VEGF- $\alpha$ ). En los osteoblastos, este factor juega un papel importante en el acoplamiento de la formación de hueso y de la angiogénesis, actuando como un quimioatrayente para células vecinas endoteliales (Deckers *et al* , 2002; Li *et al* , 2005; Fiedler *et al* , 2002). La proliferación vascular en relación a las condensaciones preosteoblásticas durante la formación de hueso *de novo* favorece la transición de MSCs a fenotipo osteoblástico.

Antes de la diferenciación, las células precursoras de los osteoblastos deben formar uniones mediadas por integrina para que se unan a moléculas extracelulares de la matriz. Las integrinas son receptores transmembrana que interactúan con la unión a determinadas secuencias de péptidos de las moléculas del espacio extracelular (Arnaout 2002). Estas secuencias peptídicas se encuentran en numerosas proteínas de matriz extracelular, incluidas fibrina, colágeno, fibronectina, vitronectina, osteopontina y sialoproteína ósea.

Así, los preosteoblastos se guían por contacto con las proteínas de matriz extracelular por mediación de la integrina, y a su vez, los osteoblastos maduros establecen una comunicación con la matriz extracelular a través de las integrinas, adecuando su secreción al estado del medio externo (Schneider *et al* , 2004; Rezanian *et al* , 1999). Mediante estas moléculas, se puede transferir al núcleo celular información sobre el estrés y la tensión de la matriz extracelular, dando como resultado la síntesis y secreción de proteínas óseas o matriz de mantenimiento.

Los osteoblastos inician la formación ósea a través de secreción de la matriz osteoide, una matriz ósea no mineralizada. Más tarde, continúan su aporte mediante vesículas especiales llamadas vesículas de matriz, aportando minerales de apatita y fosfatasa alcalina. El contenido de las vesículas de matriz interactúa con el colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular para formar la matriz mineralizada.

Los osteoblastos rodeados de su matriz mineralizada se convierten en osteocitos. Esta formación ósea temprana es menos organizada y se define como *bowen bone*. Las fuerzas de tensión y deformación conducen a los osteoclastos a la remodelación y la formación de hueso maduro, identificado por la organización de los sistemas de Havers, que son las unidades funcionales del hueso. La formación de hueso maduro continúa con la síntesis de osteona cortical y los componentes de la médula ósea.

### 1.3- El embrión de pollo. Crecimiento mandibular y morfogénesis.

La embriología es una rama de la biología que se ocupa de la formación, crecimiento y desarrollo temprano de los organismos vivos. Es una subdivisión de la anatomía y siempre ha sido un área esencial de la investigación básica (Susan *et al* , 2008). El ritmo de la investigación embriológica se ha amplificado exponencialmente a lo largo del siglo 20, incluso llevando a desacuerdos éticos prolongados (Edwards *et al* , 2007). No obstante, los embriones de pollo han demostrado ser un modelo animal eficaz para estas investigaciones (Pourquié *et al* , 2004; Limura *et al* , 2008)

Desde que Aristóteles identificase al embrión de pollo como el sujeto de estudio ideal para los estudios embriológicos al desarrollarse en un compartimento aislado de la madre, ha sido un modelo ampliamente utilizado para la embriología descriptiva y experimental . Además, en las última décadas ha demostrado ser de un gran valor en la profundización a nivel molecular de procesos básicos de biología del desarrollo, o en investigación médica (Hung *et al* , 2012; Bush *et al* , 2013; Gong *et al* , 2012).

La gestación de un embrión de pollo dura 21 días, y su desarrollo se divide en 46 estadios (Hamburger & Hamilton, 1951). A continuación haremos un breve resumen del desarrollo del proceso mandibular del primer arco branquial del cual deriva la mandíbula. (Mina *et al* , 2001)

Estadio de desarrollo	Tiempo de incubación	Eventos morfogenéticos
St 13	48-52h	Tubo cardiaco
St 14	50-53h	Sistema circulatorio
St 15	50-55h	Vesícula óptica completamente formada
St 23	84-96h	Alargamiento del proceso maxilar
St 26	108h-120h	Formación del cartílago de Meckel
St 27	120h	Formación del pico
St 28	132h	3 digitos, 4 dedos
St 29	144h	5º dedo primitivo
St 30	156h	Germen de las plumas
St 31	168h	células ectomesenquimales se diferencian en huesos membranosos
St 32	180h	la punta de la mandíbula ha alcanzado al pico maxilar
St 33	187,2h	Red en el margen radial del ala u 1º dígito
St 34	192h	Membrana nictitante
St 40	336h	El cartílago de la manbrana ósea rodea al cartílago de Meckel

**Tabla 1:** Estadios del desarrollo del embrión de pollo y eventos morfogenéticos asociados.

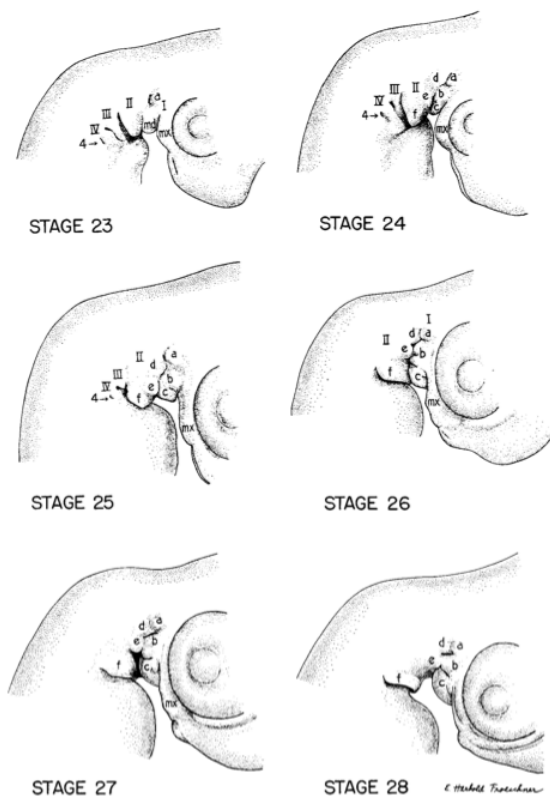
El esqueleto mandibular del pollo deriva a partir de células migratorias de la cresta neural craneal (CNCC). Ectodérmica en origen, pero mesenquimales en la naturaleza, se les conoce como células ectomesenquimales. Durante las etapas tempranas del desarrollo (a partir de 5,5 días de incubación; Hamburguer y Hamilton (1951); estadio 26), células ectomesenquimales producen una sola barra cartilaginosa (cartílago de Meckel) en el núcleo de cada mitad del arco mandibular.

De 7 a 7,5 días de incubación (estadio 31) en adelante, las células ectomesenquimales dan lugar a los huesos membranosos por osteogénesis directa. Al día 14, el cartílago de la membrana ósea rodea al cartílago de Meckel a lo largo de la longitud de la mandíbula (Romanoff *et al* , 1960; Murray *et al* , 1963).

Se ha demostrado previamente que las interacciones epitelio-mesénquimales desempeñan un papel clave en la inducción de tanto la condrogénesis y osteogénesis mandibular del ectomesénquima (Hall *et al* , 1987b, 1988a, 1994). La osteogénesis depende de las interacciones que continúan a partir de estadio 24 (Hall *et al* , 1978).

Durante el desarrollo normal, la mandíbula está formada por el componente mandibular del primer arco branquial. Los procesos mandibulares son estructuras bilaterales simétricas localizadas debajo de la futura cavidad bucal, compuestos de tejido mesenquimal rodeado por una capa de epitelial de origen ectodérmico y endodérmico.

Después de su formación inicial, estos procesos se someten a una considerable extensión a lo largo de los tres ejes, emergen en la región media y dan lugar a la forma triangular elongada de la mandíbula. Además de fusionar en la línea media con el contralateral, el proceso mandibular también se une lateralmente con el proceso maxilar y en los bordes inferiores con el proceso hioide.



**Figura 2.** Esquema del desarrollo de los arcos branquiales de los estadios 23-28 (Hamburguer and Hamilton, 1951).

- I-IV: arcos branquiales.
- mx, md: procesos maxilar y mandibular.
- 4: hendidura visceral.
- a, b y c: protuberancias en el proceso mandibular
- d, e y f: protuberancias en el 2º arco branquial.

#### 1.4- Origen celular de las células de la cresta neural craneal

El mesénquima del proceso mandibular, como en otros procesos faciales, es un derivado de las células de las crestas neuronales craneales (CNCC) y el mesodermo paraaxial. De las CNCC emerge la mayoría del esqueleto craneofacial (Le Douarin *et al* , 1994; Osumi-Yamashita *et al* , 1997; Schilling *et al* , 1997). Por otra parte, el mesodermo paraaxial forma parte de los músculos craneofaciales además de algunos elementos esqueléticos del cráneo y tejidos vasculares (Noden *et al* , 1983b, 1998, Conly *et al* , 1992, 1993).

El potencial esqueletogénico de las CNCC se encuentra restringido a la región cefálica. Además de contribuir a la formación de las estructuras esqueléticas, las CNCC dan lugar a los sistemas de nervios periféricos y de tejido conectivo asociados a los músculos faciales. (Noden *et al* , 1986, 1998; Conly *et al* , 1992; Kontges y Lumsden 1996; Osumi-Yamashita 1997).

El destino final de las células CNCC han sido extensamente analizado en embriones de aves y mamíferos (Le Douarin *et al* , 1994, 1997; Osumi-yamashita *et al* , 1997; Feillet *et al* , 1999). La identificación de los rombómeros (R), una serie de estructuras segmentadas en el cerebro posterior, ha permitido la realización de esquemas de rutas de migración de las CNCC y sus derivados en mapas de destino a corto y largo plazo. (Lumsden *et al* , 1991; Serbedzija *et al* , 1992; Couly *et al* , 1993, 1996, 1998; Kontges y Lumsden, 1996).

Como conclusión, se acepta que las CNCC que forman el esqueleto mandibular tienen su origen en varios rombómeros (R1, R2 y R4) (Conly *et al* , 1996; Kontges y Lumsden 1996). Además de este aporte, el cartílago de Meckel está poblado por células no CNCC procedentes de la región central del tubo neural. (Noden *et al* , 1983b, 1986, 1988; Trainor *et al* , 1999; Trainor y Tam, 1995; Hacker y Guthrie 1998).

Desde hace años, se ha pensado que el patrón de los elementos esqueléticos en el arco mandibular es el resultado de especificaciones morfológicas intrínsecas de las CNCC (Hostadius y Sellman 1946; Wagner *et al* , 1949; Noden *et al* , 1983a, 1988). De esta manera, las CNCC son morfológicamente pre-especificadas, y los patrones son impresos en las CNCC pre-migratorias mientras todavía se encuentran en el tubo neural. Existen diversos genes (entre ellos la familia Hox) implicados en esta preespecificación, cuya expresión se inicia en los rombómeros y se mantiene durante la migración de las CNCC. (Hunt *et al* , 1991a, 1991b; Krumlanf *et al* , 1994; Schilling *et al* 1997; Morrison *et al* , 1998; Wilkinson *et al* , 1995).

Aunque los experimentos originales de Noden (1983a) apoyan este modelo, los resultados de los estudios más recientes con trasplantes entre embriones han dado resultados conflictivos (Prince y Lumden, 1994; Saldivar *et al* , 1996, 1997; Conly *et al* , 1998). En estas situaciones, se modifica el código Hox en ciertas localizaciones ectópicas, modificando su destino final en función de la región en la que las CNCC se encuentran. Los resultados de estos estudios sugieren que el código Hox en el arco

branquial puede ser establecido independientemente después de la migración de CNCC a los arcos branquiales.

La modificación de la expresión de Hox en los arcos branquiales colonizados con poblaciones mezcladas de CNCC se piensa que están mediadas por “efectos de comunidad”, donde el código Hox expresado por la mayoría de las células, eventualmente predomina y resulta en la ganancia o pérdida de la expresión de Hox (Saldivar *et al* , 1997; Hunt *et al* , 1998). Alternativamente ha sido postulado que la alteración de la expresión de Hox pueda ser mediada por influencias ambientales provenientes de tejidos adyacentes (Ejm: mesodermo, arcos branquiales, tubo neural) (Kontges y Lumsden, 1996; Hunt *et al* , 1998).

Existen otros genes implicados en la regulación del destino final de estas células. Estos genes incluyen miembros de las familias Msx, Dlx, Otx, Barx, Gsc, Pax, Hand, Pitx y Prx. Como factores de transcripción, regulan a su vez la expresión de otros genes reguladores, configurando una compleja red de señales que controla el destino celular y, con ello, la formación del proceso mandibular (Mina *et al* , 2001).

Como conclusión, vemos que la especificación a nivel molecular del destino celular en el arco mandibular no es tan inamovible como se planteaba hace tres décadas. Aunque existe cierta programación inicial, el mecanismo es dinámico y puede ser afectado por influencias ambientales, sirviendo como un sustrato perfecto para la experimentación en laboratorio. Así, podemos estudiar el efecto de determinados factores de diferenciación (como la BMP-2) en las células que forman el esqueleto mandibular, siendo posible observar una variación en el fenotipo del organismo en respuesta a diversas condiciones experimentales.

### **1.5- Expansión del proceso mandibular.**

Los estudios basados en la biología del desarrollo tisular indican que la expansión del proceso mandibular es dependiente de las interacciones epitelio-mesenquimales (Wedden *et al* , 1987; Richman and Tickle, 1989; Hall y Coffin-Collins, 1990; Mina *et al*, 1994).

Después de la eliminación del epitelio suprayacente, las señales derivadas del epitelio mandibular regulan el crecimiento del mesénquima subyacente. (Richman y Tickle *et al*, 1989). La expansión del mesénquima mandibular es apoyada por la cobertura epitelial de otros procesos faciales, y a su vez, el epitelio mandibular apoya la extensión del mesénquima de otras estructuras.

Aunque estos estudios indican claramente los papeles mitogénicos del epitelio mandibular en el mesénquima subyacente, estos no identificaron las regiones específicas del epitelio o mesénquima que pueden estar implicados en la regulación de la expansión de la mandíbula en desarrollo. Además, el arco mandibular, similar a otros procesos faciales, carece de claramente de regiones morfológicas o funcionales identificables.

Los estudios realizados en la mandíbula de pollo en desarrollo sugieren que una población de células en la región medial juegan un papel importante en el crecimiento de la mandíbula en desarrollo. (McGonnell *et al* , 1998).

Los estudios de proliferación celular mostraron un alto porcentaje de células en fase S etiquetados en la región medial (Mina *et al* . 1995;. Barlow y Francis-West 1997;. McGonnell *et al* . 1998). Por otra parte, cuando se cultivó como un injerto la región media de los arcos mandibulares en la superficie dorsal de un ala del pollo durante una semana (st 24), se observó la formación de barras de cartílago de longitud sustancial (Richman y Tickle, 1989; Mina *et al* , 2002). En conjunto, estas observaciones sugieren que la región medial es una región funcional involucrada en la regulación de la derivación direccional de la mandíbula en desarrollo.

### **1.6- Oseointegración: mecanismos y rutas de diferenciación tisular.**

En este apartado se tratará la oseointegración desde una perspectiva biológica, con objeto de profundizar en el proceso de formación de hueso en organismos adultos tras un daño en el tejido óseo. En este proceso, existen protagonistas comunes que aparecen también en el desarrollo embrionario, aunque los mecanismos y las vías de señalización activadas presentan ciertas particularidades que requieren ser descritas.

Bränemark (1983) en los años 50, realizó las primeras observaciones sobre la oseointegración del titanio al hueso. La oseointegración se definió en un primer término como la fijación estable del titanio al hueso. A partir de esto, se determina que este concepto puede ser útil para el diseño de otros anclajes prostéticos dentales y ortopédicos (Worhtington *et al* , 1997; Bränemark *et al* , 1959).

Varios factores afectan a la fuerza y velocidad de oseointegración, incluyendo la geometría superficial del implante, superficie química, su naturaleza y la técnica de la preparación del lecho receptor, y los grados de estrés y tensión en el implante durante las fases tempranas de la oseointegración (Martin *et al* , 1995; Lincks *et al* , 1998).

La calidad de la regeneración ósea de la interfase hueso-implante y la unión del tejido al implante dependen de la vascularización y del potencial osteogénico. El espacio medular es la fuente de células madre, factores de crecimiento y diferenciación, hueso soluble, proteínas del plasma y vasos que contribuyen a la respuesta de la regeneración ósea. (Davies *et al* , 2000). Los implantes endoóseos se integran al hueso mediante tres mecanismos: osteoconducción, formación de hueso *de novo* y remodelación ósea.

La regeneración ósea y la unión a la superficie del implante se debe a una mezcla de dos diferentes rutas, denominadas osteogénesis a distancia y de contacto (Osborn *et al* , 1980).

En la osteogénesis a distancia, la regeneración ósea se extiende a través de la deposición ósea desde la superficie de la osteotomía ósea hacia la superficie del implante. Un coágulo de sangre, incluyendo fibrina y plaquetas, se forma en la

osteotomía del *gap* para realizar el proceso fisiológico de la curación de la curación ósea (Park *et al* , 2000, 2001).

Una respuesta inflamatoria, incluyendo la presencia de monocitos, provoca el desarrollo de los osteoclastos que atacan a la superficie ósea dañada. Los receptores de BMP-2 están localizados en los monocitos, posibilitando la quimiotaxis a la zona afectada.

La osteocalcina, que se encuentra en la matriz extracelular del hueso expuesto, actúa como señal para la diferenciación de los osteoclastos (Glowacki 91). Los osteoclastos migran y se unen las superficies óseas a través de un proceso mediado por integrina, en los cuales éstos forman una zona de sellado llamada *howship's lacunae*. Los osteoclastos secretan ácidos y enzimas hidrolíticas, conduciendo a localizar las superficies reabsorbidas de hueso y la exposición de la matriz extracelular del hueso que contiene BMPs.

Las células osteoprogenitoras son reclutadas de la médula o el periostio. Los pedicitos asociados con la reparación de vasos se diferencian en las superficies óseas existentes. Los osteoblastos forman nueva matriz osteoide, guiando a la aposición de hueso trabecular, que llena el hueco tras la osteotomía y uniéndose a la superficie del implante. Esta forma de unión de oseointegración es caracterizada por una capa de células interpuestas entre la matriz ósea y la superficie del implante.

En la oseointegración a distancia, la reabsorción osteoclástica de las superficies expuestas de hueso conduce a el desarrollo de la osteogénesis y a la aposición ósea en dirección al implante.

La osteogénesis de contacto se basa más en los procesos de la formación de hueso *de novo*. El fresado quirúrgico y la preparación ósea para la colocación del implante da como resultado una cascada de eventos que imitan la curación normal ósea. La superficie del implante es inicialmente recubierta en sangre y proteínas del plasma que son absorbidas a la superficie del implante.

La fibrina en la zona de curación se vuelve adherente a la superficie del implante y actúa como matriz temprana para las células que participan en el proceso de la curación de la herida. Las plaquetas casi inmediatamente se unen a la superficie del implante, seguidas por la activación de las plaquetas y la liberación de las citoquinas y factores de crecimiento dentro del hueco producido por la osteotomía (Masuda *et al* , 1997).

La retención de la fibrina y la activación de las plaquetas son mejoradas por las superficies de los implantes con microtexturas. Los neutrófilos se han unido a la superficie del implante y subsecuentemente se han activado. Los neutrófilos activados producen oxígeno reactivo en la superficie de los implantes a través de la unión de la membrana de la NADPH oxidasa y además juega un papel en la oxidación secundaria de la superficie del implante.

Los neutrófilos funcionan como fagocitos, y a someterse a la maduración por autólisis y la liberación de las citoquinas inflamatorias, incluyendo protaglandinas y leucotrienos. Los monocitos localizados en los coágulos de sangre atacan a la superficie del implante mediante una vía mediada por integrina asociada con suero de fibronectina y vitonectina (Berton *et al* , 1999).

Los monocitos se diferencian a macrófagos que atacan a las superficies de titanio oxidadas a través de integrinas, una función que es mejorada por las microtexturas. Los macrófagos además contribuyen a el nicho de la superficie del implante mediante la secreción de factores óseos de sialoproteína y osteopontina asociados a la mineralización ósea (McKee *et al* , 1996).

La superficie del implante a la que se unen los macrófagos también contribuye a la formación e hueso de novo a través de la osteoinducción por la vía de la síntesis y secreción de los factores de crecimiento derivados de la plaquetas  $\beta$  (PDFG- $\beta$ ) y BMP-2 (Champagne *et al* , 2002). En la oseointegración de contacto, los macrófagos atacan a las superficies acondicionadas del implante y sintetizan y secretan BMPs.

Ambos procesos probablemente existan en la mayoría de los casos de la colocación de un implante y además, los macrófagos derivados de los monocitos y los osteoclastos juegan un papel primordial en la señalización a través de BMPs en la formación de hueso *de novo* sobre la superficie de los implantes.

### **1.7- La quitina como vehículo**

La quitina es el componente orgánico más abundante en la estructura esquelética de muchas de las clases que conforman al grupo de los invertebrados (artrópodos, anélidos, moluscos y celenterios). También se encuentra en algunos hongos como los ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos y en algas como las diatomeas. Es la segunda sustancia orgánica más abundante después de la celulosa, aunque posee una mayor tasa de recambio que esta última. (Pastor *et al* , 2004)

La matriz de los exoesqueletos de crustáceos está formada por quitina asociada a proteínas, pigmentos y sales inorgánicas (Hackman *et al* , 1955). El complejo-quitina conforma una matriz de protección y su rol biológico es servir de defensa contra la acción de las quitinasas (Jeuniaux *et al* , 1959).

La quitina se obtiene después de realizar sobre la matriz original sucesivos procesos de desproteización en medio alcalino y de desmineralización en medio ácido. Después de cada uno de estos procesos, la muestra se lava sucesivamente hasta alcanzar pH neutro. Finalmente, el material seco se somete a caracterizaciones que definirán sus propiedades como, por ejemplo, el grado de acetilación (GA) o el grado de desacetilación (GD). Cabe destacar la insolubilidad de la quitina en medios ácidos, alcalino y en la mayoría de los solventes orgánicos.

Diversos autores proponen diferentes tipos de asociaciones entre quitina y la cadena de proteínas (Hunt *et al* , 1970). Examinando las proteínas hidrolizadas por ionoforesis

y cromatografía de papel, se comprobó la presencia de ácido aspártico e histidina, además de D-glucosamina. Ello permitió a Hackman (Hackman *et al* , 1960) concluir que esos dos aminoácidos son involucrados en el enlace quitina-proteína.

Los diferentes enlaces quitina-proteína dependen de la materia prima. Hackman y Goldberg (Hackman *et al* , 1958) utilizaron diferentes condiciones de extracciones para reconocer e identificar dichos enlaces. Así determinaron que se pueden producir enlaces de fuerzas de Van der Waals; por puentes de hidrógeno; uniones electrostáticas y enlaces covalentes.

Los usos y aplicaciones que poseen la quitina y sus derivados son múltiples debido a sus propiedades funcionales y fisicoquímicas, y abarcan campos tan variados como el de la alimentación, la medicina, la agricultura, la cosmética, la farmacia y el control ambiental entre otros.

La quitina, dada su insolubilidad en la mayoría de los solventes, es un buen candidato para aplicaciones en las que actúe en estado sólido (como los campos de adsorción y complejación). Una gran variedad de usos médicos de la quitina y sus derivados ha sido reportada por Whistler (1983) y por Yalpani y col (1992). Estos estudios sugieren que la baja solubilidad de la de la quitina aunque parezca una limitación, tiene aplicaciones como material para hacer fibras de suturas absorbentes y vendajes que pueden resistir el ataque de la bilis, ácido úrico y jugo pancreático, alimentos dietéticos anticolesterolémicos, vehículos para la liberación controlada de fármacos (Nakijama *et al* , 1984). Este uso como sistema de liberación controlada de fármacos es el motivo por el que nos interesa en nuestro grupo de investigación.

En el ámbito de la salud oral, las investigaciones demuestran que las propiedades bacteriostáticas del quitosano (derivado de la quitina) previenen el mal aliento y a la formación de placa. Se han realizados estudios con un enjuague bucal con quitosano que demuestra su gran potencial como agente antiplaca (Sano *et al* , 2003).

Las sales de quitosano que se agregan a las pastas dentales enmascaran el sabor, los olores desagradables del óxido de silicio y de otros polvos usados como ligantes.

La quitina y el quitosano adsorben la *Candida Albicans*, hongo que se encuentra en nuestra flora saprofita pero que asume papel patógeno oportunista ante un cambio en el sistema inmunitario del huésped (toma de antibióticos prolongada, sujeto inmunodeprimido por diversas causas...).

La amplia variedad de aplicaciones que tiene la quitina y sus derivados, estudiada por distintos grupos de investigación, hacen que esta sustancia cree grandes posibilidades de productos con propiedades ideales en múltiples campos y en concreto en la biomedicina y la ingeniería tisular.

### **1.8- Antecedentes del grupo de investigación.**

El laboratorio de Ingeniería de Tejidos dirigido por el Profesor José Luís López Lacomba y el Profesor José Sanz Casado, se encuentra en el Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid. Los trabajos que se realizan se centran en el estudio de nuevos materiales para su aplicación en la regeneración de tejido óseo, así como en la obtención de factores de diferenciación óseos con el mismo fin. (Ander Abarrategui *et al* , 2012; Yaiza Lópiz-Morales *et al* , 2010).

El estudio de nuevos materiales se inicia con el diseño y producción de estructuras 2D y 3D. En este sentido, las vías de investigación se encaminan principalmente en varios grupos de materiales diferentes. Entre ellos, destaca la quitina y su derivado, el quitosano; cerámicas de  $\beta$ -TCP e hidroxiapatita y matrices de nanotubos de carbón.

Actualmente se trabaja en diferentes localizaciones anatómicas para la aplicación de los materiales estudiados. Estos ensayos se realizan en los modelos animales tales como ratones, ratas, conejos, perros, cerdos, ovejas y por último pollos.

Puesto que los factores de diferenciación son una pieza clave para la regeneración de tejido, gran parte del esfuerzo científico del grupo se ha centrado en la obtención y caracterización de estos factores, fundamentalmente rhBMP-2, rhBMP-4 y rhBMP-7, que se utilizan para activar los materiales propuestos. Para ello, se ha dotado al laboratorio del instrumental necesario para la realización de ensayos de biología molecular y celular.

Como consecuencia de las diferentes líneas de investigación iniciadas, como la de este trabajo de embriología codirigido por el Dr. José Sanz y el Dr. Enrique Martínez, se están obteniendo numerosos resultados materializados en contribuciones a congresos, artículos científicos, proyectos de investigación y colaboraciones con diferentes grupos y empresas.

## 2- JUSTIFICACIÓN

Como se ha podido revisar en la Introducción, existe una larga tradición en el estudio del efecto de la BMP-2 en la morfogénesis del embrión de pollo. Aunque hay descritos estudios previos de la acción de este factor en el proceso mandíbular (Ekanayake *et al*, 1997; Mina *et al*, 2001, Mina *et al*, 2002), resulta necesario valorar el papel de la BMP-2 dentro de la jerarquía actual de las redes de regulación génicas que dirigen el desarrollo mandibular. Además, también es relevante el estadio de desarrollo en el que se implanta este factor de manera experimental, al igual que la recogida de los embriones para su análisis posterior. En este sistema dinámico, una diferencia de horas puede llevar a conclusiones muy diferentes, por lo que se optimizará tanto el momento temporal como el método con el que serán operados estos embriones.

Por otro lado, es de gran interés analizar el vehículo utilizado para la administración de BMP-2 en nuestro modelo embrionario. La gran variedad de biomateriales disponibles para la liberación controlada de este factor permite una gran libertad a la hora de elegir una posible opción óptima. El uso de micropartículas de quitina puede abrir una nueva línea de experimentación que permita en un futuro valorar una posible aplicación en cirugía oromaxilar.

Por todo lo descrito anteriormente, este Trabajo Final de Máster analiza la acción de la BMP-2 en la diferenciación ósea de los mamelones maxilar y mandibular en los estadios de desarrollo cercanos a la formación del cartílago de Meckel (st26). De esta manera, se busca influir en el comportamiento de las células mesenquimales allí presentes, sensibles a este estímulo, con objeto de provocar una diferenciación ectópica a fenotipo óseo que demuestre la correcta administración de nuestro factor.

Por último, se valoran los resultados obtenidos incluyendo un enfoque odontológico con objeto de que, en el futuro, pueda existir una aplicación práctica para la regeneración ósea maxilar y mandibular.

### **3-OBJETIVOS**

- 1- Establecer un método óptimo para la implantación de biomateriales en el embrión de pollo *in ovo*.
- 2- Optimizar los protocolos histológicos para fijación, corte y tinción de embriones de pollo.
- 3- Iniciar el estudio de la biocompatibilidad de micropartículas de quitina en modelos embrionarios.
- 4- Comenzar el análisis del efecto osteogénico de la BMP-2 en el proceso mandibular del embrión de pollo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

## 4-MATERIALES y MÉTODOS

### 4.1- Animales de experimentación y obtención de tejidos.

Los embriones de pollo fueron obtenidos de huevos marrones fértiles (*Isa Brown*) de la granja Santa Isabel (Córdoba). Los huevos se incubaron a temperatura (38 °C) y humedad constante hasta los estadios embrionarios necesarios según la clasificación de Hamburger y Hamilton (1951).

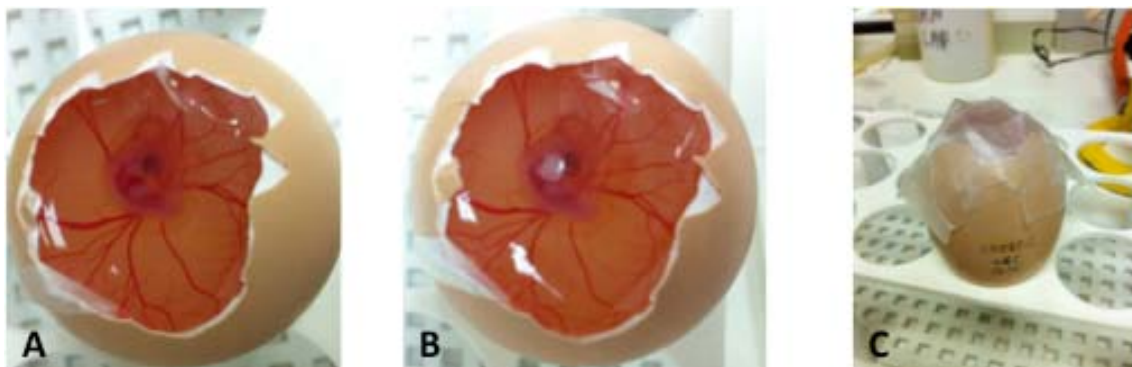
### 4.2- Obtención de control de quitina y asociada a BMP-2.

La quitina (SIGMA) empleada en este estudio tiene procedo de caparazones de langostinos. Se pulverizó utilizando un molino de vacío (FRITSH Pulverisette 14) con un filtro de 0.08 micras, obteniendo una quitina de un tamaño menor de 0.08 micras.

Se esterilizó mediante autoclave y se emplearon 200 miligramos para unirla con la proteína rhBMP-2 a 1 microgramo/microlitro. Se comprobó por espectrofotometría la cantidad de proteína adsorbida (Specord 205 Analytikjena) a 280 nm.

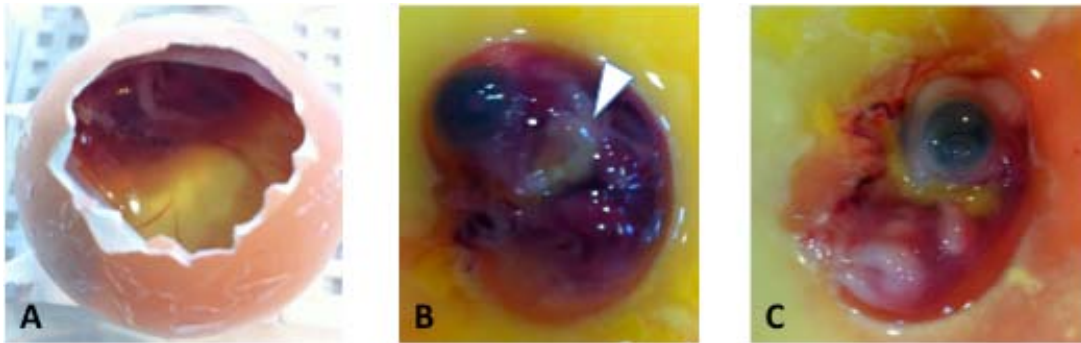
### 4.3- Colocación de quitina y quitina con BMP-2 directamente sobre el embrión.

La operación se realizó con aguja imantada para perforar la cáscara y pinzas de disección para abrir una ventana que permitía el acceso al embrión. Luego se colocó el material con pinzas en la zona maxilar; quitina en los controles y un concentrado de quitina con BMP-2 a una concentración 1 microgramo/microlitro en los sujetos experimentales. Después, se sellaron los huevos con parafilm (BEMIS. USA) y cinta adhesiva. Los huevos operados se volvieron a introducir en la incubadora a temperatura (38 °C) y humedad constante uno o siete días más para la recogida de las muestras. Para la obtención de embriones de st 26 a st 34, primero se diseccionó el saco vitelino con tijeras y luego se utilizaron espátulas para separar al embrión de la yema.



**Figura 3.** Apertura del huevo con el embrión en st 26 (A), colocación del material (B) y sellado (C). Todo el proceso se realiza en un ambiente estéril mediante el método de la llama e instrumental esterilizado. La perforación de la cáscara se utilizaba una aguja imantada y pinzas quirúrgicas. Para la colocación del material, se usaron otras pinzas quirúrgicas con las que se obtenía el material y se depositaba sobre el proceso maxilar del embrión.

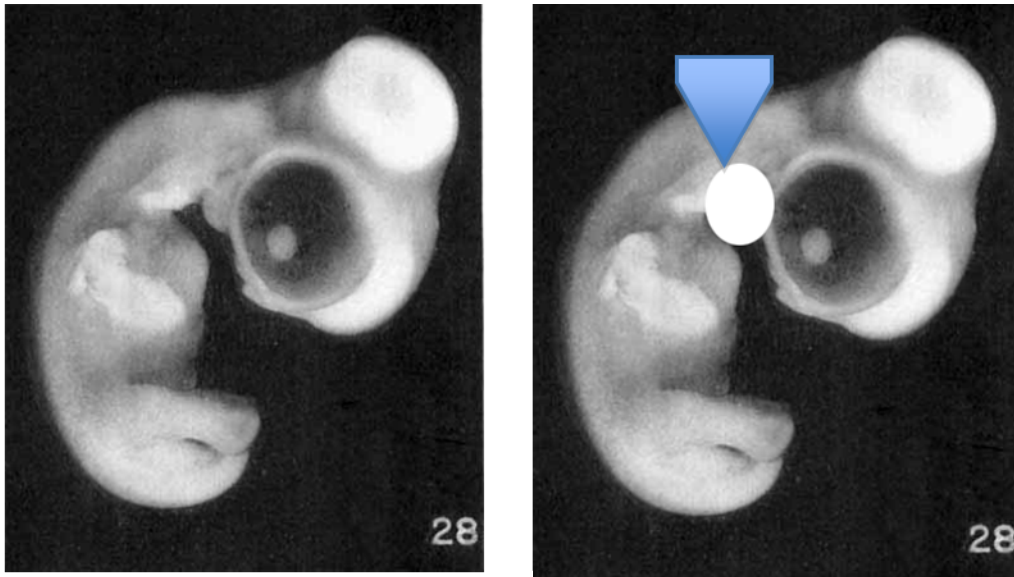
El sellado se obtenía mediante la colocación de film de laboratorio y celo, para posteriormente volver a introducir los huevos a la incubadora.



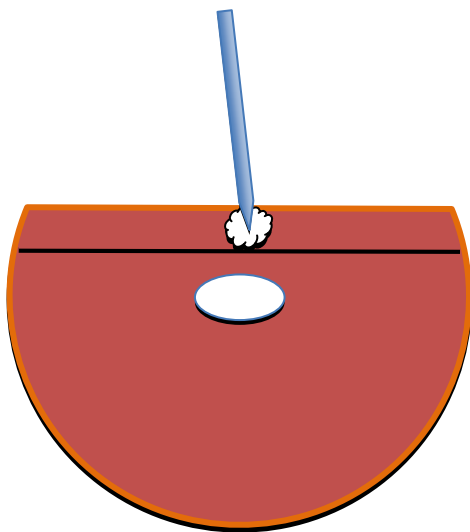
**Figura 4.** Retirada del film sellador tras 7 días de incubación (A), nótese el aspecto hemorrágico del embrión en st 34. Obtención de los embriones del grupo BMP-2 más quitina (B) y quitina en st 31 (C), tras 7 días de incubación. En el embrión experimental (B) la flecha blanca señala que aún persiste el material implantado, aunque el sujeto está muerto posiblemente debido a una sobredosis de BMP-2. El embrión control, presenta un aspecto de un estadio de menor desarrollo y también ha fallecido. Los motivos de la muerte se deben a la manipulación y posible contaminación al presentar perforación en el film sellador.

Estadio de desarrollo	Tiempo de incubación
St 26	108h-120h
St 27	120h
St 28	132h
St 29	144h
St 30	156h
St 31	168h
St 32	180h
St 33	187,2h
St 34	192h

**Tabla 2.** Estadios de desarrollo del embrión de pollo con su correspondiente tiempo de incubación.



**Figura 5.** Estadío 28 del embrión de pollo y área donde se coloca el material resaltada en blanco. (Hamburguer and Hamilton, 1951).



**Figura 6.** Esquema del primer procedimiento operatorio. El material se coloca sobre la membrana amniótica, en el área del primer arco branquial, pero nunca entrando en contacto directo con el embrión representado con la elipse blanca

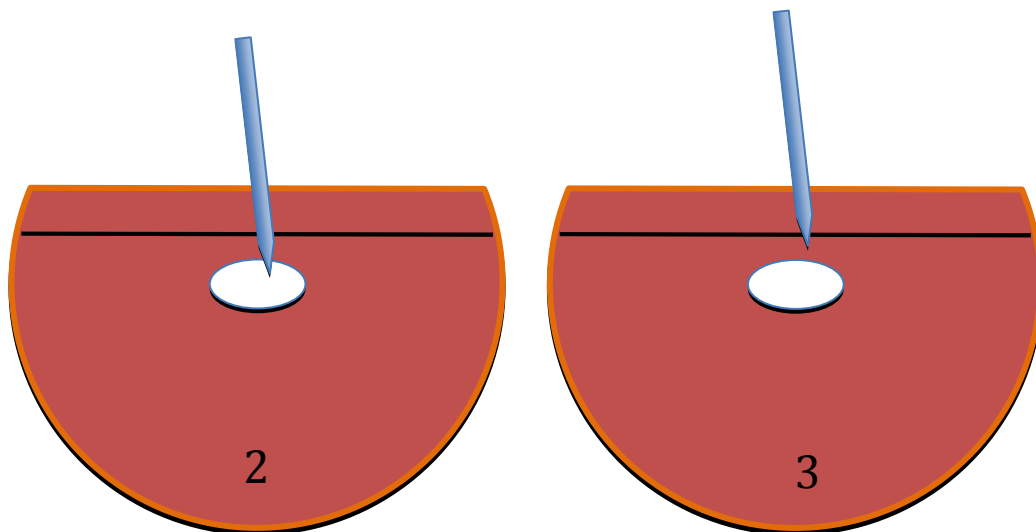
Tras la operación, las muestras se guardaron en pocillos con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS y almacenados a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tras haber sido fijados durante un período de 3 días, se realizó la escalera de etanoles (80%, 96% y absoluto) para deshidratar al embrión e incluirlo en bloque de parafina. Los bloques se cortaron con un microtomo (Leica RM 2155) a 5 micras y se colocaron los cortes en portas Starfrost (Knittel Glass). Los cortes se tiñeron mediante la tinción básica de tricómico de Masson. El montaje de los cortes en los portas se realizó con el kit de montaje de cubreobjetos, EUKITT (EMS), según las instrucciones del fabricante.

#### 4.4- Implantación de quitina y quitina con BMP-2 realizando dos procedimientos operatorios adicionales.

Como en el anterior experimento sólo se colocó el material sobre el embrión, para ésta segunda aproximación se buscó insertar directamente el material en la zona de desarrollo del maxilar, en el primer arco branquial. La cirugía se realiza mediante una incisión con instrumentos de tungsteno en la membrana amniótica, y luego se realiza un bolsillo en el mesénquima de la zona del primer arco branquial al que se le introduce el material.

En esta segunda experiencia, se realizan cuatro grupos de estudio, los cuales son control de apertura del huevo, control con cirugía sin colocación del material, control de quitina insertándose en un bolsillo en el mesénquima del embrión y por último, grupo experimental al que se le implanta BMP-2 con quitina mediante el procedimiento quirúrgico de practicar un bolsillo en el mesénquima.

Paralelo a este ensayo, se realiza otro experimento adicional, donde se realiza una tercera cirugía a la que sólo se le practica una incisión en el saco amniótico para exponer al embrión pero no se le practica el bolsillo en el mesénquima. Se utilizaron tres controles de quitina y tres de BMP-2 y quitina.



**Figura 7.** Esquemas de los procedimientos quirúrgicos 2º y 3º. En 2, se realiza un bolsillo quirúrgico en el mesénquima para introducir el material y así esté localizado y en íntimo contacto en la zona del primer arco branquial. En 3, solamente realizamos la incisión de la membrana amniótica para probar una colocación sobre el embrión evitando la membrana barrera, al contrario que con el método 1º.

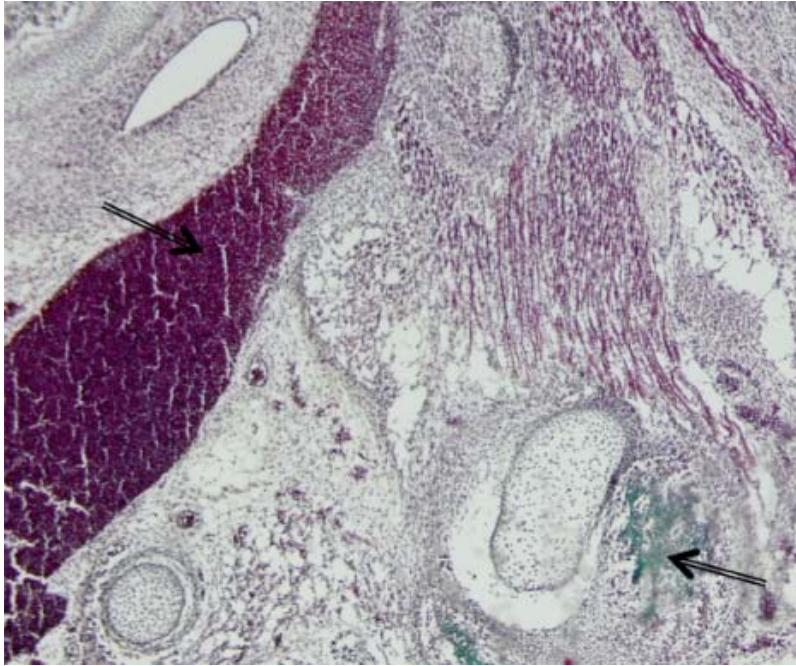
#### 4.5- Tinciones histológicas.

La tinción tricrómica de Masson, al igual que otras tinciones tricrómicas, es una técnica de coloración especial que permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas o haces, diseñados para dar resistencia; también evidencia, aunque en menor intensidad, las fibras reticulares. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno.

Primeramente, se tiñen las secciones con un tinte ácido como la Fucsina + Ponceau. Todos los elementos acidófilos del tejido tales como el citoplasma, el músculo y el colágeno se unirán a los tintes ácidos. Las secciones entonces se tratan con ácido fosfomolibdico. Ya que el citoplasma es mucho menos permeable que el colágeno, los ácidos fosfomolibdicos permiten que la Fucsina + Ponceau difunda del colágeno pero no del citoplasma. Los ácidos fosfomolibdicos tienen numerosos grupos ácidos que probablemente actúen como medio de unión entre el colágeno y verde luz, que es el tinte del colágeno. Probablemente, el pH de la solución fosfomolibdico también aumente la coloración y ayude al colágeno en la difusión o el retiro de los colorantes.

Para la tinción con tricrómico de Masson empleamos el siguiente protocolo:

1. Desparafinado: 5' de estufa y 5' de xilol/isoparafina(3' y 2').
2. Hidratación: ETOH Abs, 96º, 80º, H2O:2'
3. Hematoxilina de Weigert:4:30'
4. Lavado H2O: 2' o 20 veces
5. Nuevo lavado:10'
6. Fucsina + Ponceau BS:4'
7. Ác fosfomolibdico :2 baños; 1º-1' y 2º-4'
8. Verde luz:4:30'
9. H2O: 2' o 20 veces
10. Baño de ác acético: 4'
11. Deshidratación: ETOH 80º, 96º, Abs: 2'
12. Xilol 5'
13. Montaje



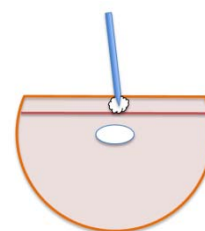
**Figura 8.** Tinción histológica de Tricrómico de Masson. Fibras de colágeno, tejido conjuntivo= Verde. Queratina, glóbulos rojos y el tejido muscular.= Rojo. Núcleo celular = Lila, marrón

## **RESULTADOS.**

### 5.1- Efecto de la implantación de quitina con BMP-2 directamente sobre el embrión *in ovo*.

Como primera aproximación, se probó un método operatorio lo menos invasivo posible para cerciorarse de la técnica y de las posibles complicaciones que se podrían aparecer, tales como contaminación o efectos negativos de la manipulación. De esta manera, el material se depositó sobre la membrana amniótica sin realizar ningún tipo de incisión (Tabla 3).

Sujeto	Condición	Estadio Operación	Tiempo incubación	Estadio Esperado	Estadio Recogida	Supervivencia operación	Estado Embrión en la recogida
1	Control quitina	26	24h	28	28	Si	Muerto (Sin latido)
2	Control quitina	26	24h	28	28	Si	Vivo
3	Control quitina	26	144h	36	31	Si	Muerto (Sin latido)
4	Control quitina	26	144h	36	26	No	Muerto (Sin latido)
1	BMP-2 y quitina	26	24h	28	27*	Si	Muerto (Sin latido)
2	BMP-2 y quitina	26	24h	28	28	Si	Muerto (Edema)
3	BMP-2 y quitina	26	144h	36	34	Si	Muerto (Edema)
4	BMP-2 y quitina	26	144h	36	26	No	Muerto (Sin latido)



**Tabla 3.** Resultados tras utilizar el primer método descrito para la implantación de las micropartículas de quitina y BMP-2. Además del estadio de desarrollo, en la tabla se registra el estado del embrión: muerto sin latido pero sin degradación aparente; muerto por edema debido a una posible sobredosis de BMP-2 y muerto por contaminación, en que se observa un aspecto degradado del tejido. El esquema muestra el protocolo de operación descrito.

De los 8 huevos operados, se abrieron cuatro de ellos 24 horas después de la operación para observar los resultados a corto plazo y la influencia de la manipulación del operador. De estos cuatro embriones, dos sujetos murieron a causa de la manipulación, sin desplazamiento de material ni aparente desarrollo. Otro embrión, al que se le colocó BMP-2 y quitina, murió por una hemorragia interna posiblemente debida a un exceso de BMP-2, pues las BMPs inducen también factores de crecimiento vasculares y endoteliales  $\alpha$  (VEGF  $\alpha$ ) (Deckers *et al*, 2002; Li *et al*, 2005; Fiedler *et al*, 2002).

Sólo un control de quitina sobrevivió a la intervención, con un desarrollo hasta estadio 30 y con el material desplazado a la parte posterior del cuello. Estas cuatro primeras muestras se fijaron en PFA al 4% para su posterior inclusión en parafina y tinciones

histológicas.

Por otro lado, otros cuatro embriones que quedaban se dejaron desarrollar durante siete días a partir de la operación para observar resultados a largo plazo. Pasado el tiempo, se recogieron las muestras, observando que todos ellos habían muerto. Dos de ellos no se habían desarrollado, puesto que habrían muerto el día de la operación como consecuencia directa de la manipulación. Los otros dos sujetos restantes se habían desarrollado hasta estadios próximos a los correspondientes por el tiempo de incubación. Por lo tanto, sobrevivieron a la intervención y su muerte debió de ser próxima a la reapertura de los huevos.

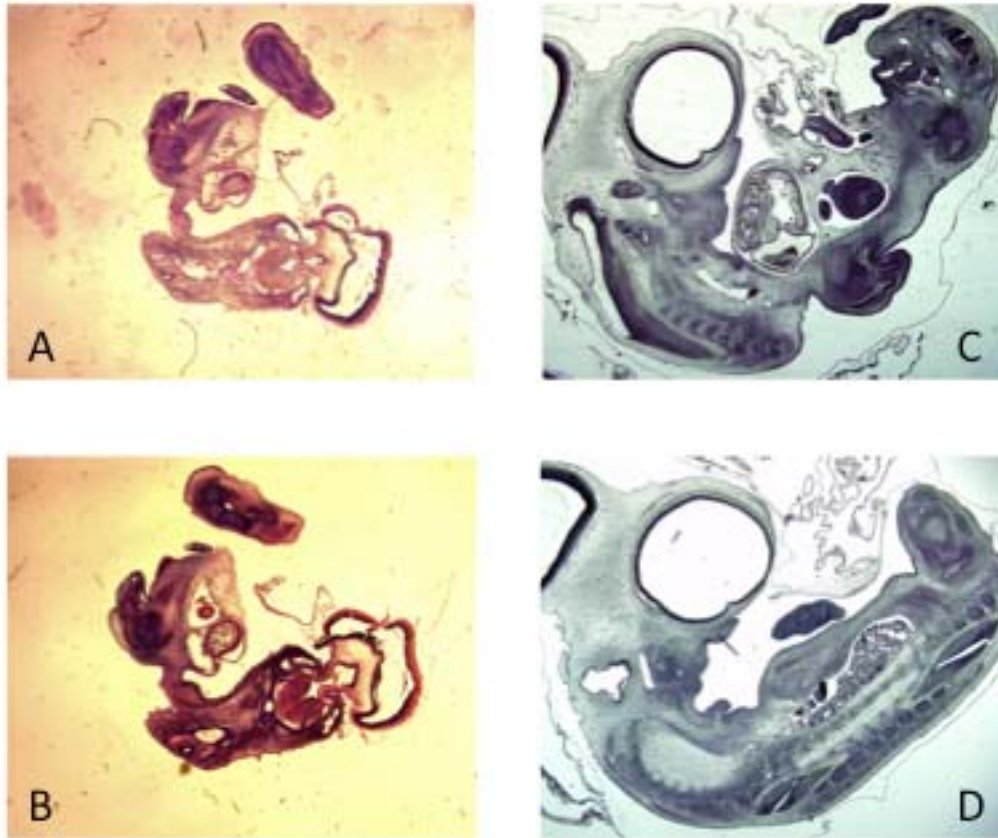
El embrión que llegó a estadio 31 operado con sólo quitina se encontró también muerto, y el film sellador mostraba una perforación, por lo que su sellado quedó comprometido y se contaminó.

En este grupo hemos documentado también la presencia de un embrión experimental al que se le aplicó BMP-2 y quitina con aspecto de morir a causa de una hemorragia interna masiva con el material aún presente en la zona del cuello, sin aparente desplazamiento del mismo. La explicación de la hemorragia interna puede deberse a una sobreexpresión de VEGF  $\alpha$  inducida por BMP-2. Aun así, el embrión pudo desarrollarse hasta el estadio 34, una diferencia importante con respecto al control, de 24 horas, que según los estudios de Hamburguer y Hamilton (1951), entra dentro de lo aceptable.

El resto de embriones se obtuvieron ese mismo día de dos huevos sin manipular, para ser controles del desarrollo sin interferencias de factores externos. Dos días más tarde, se sacaron otros tres embriones más *in ovo*, para tener una muestra representativa amplia que permita estudiar las fases del desarrollo de la osificación de los procesos maxilares y desarrollar futuros experimentos.

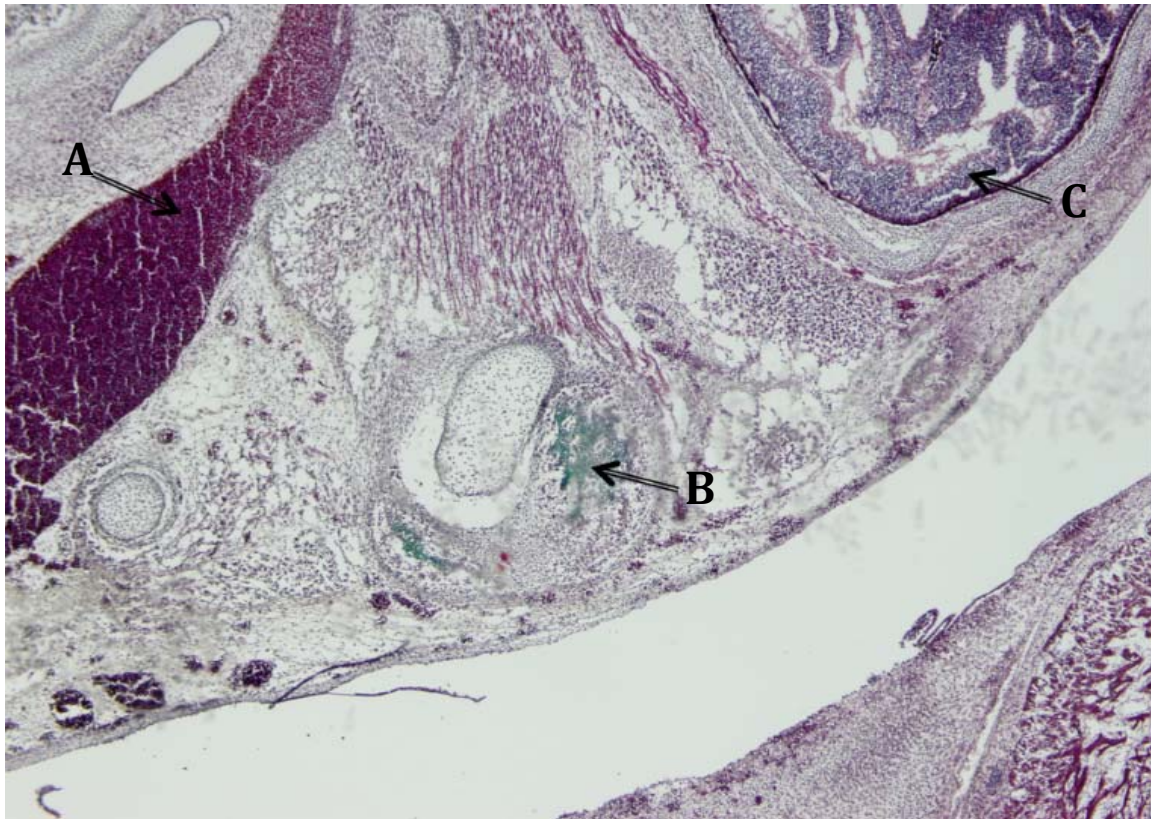
Siguiendo el protocolo existente en el laboratorio, se realizó una prueba histológica de tinciones con los embriones de menor estadio comparando las tinciones histológicas básicas de hematoxilina/eosina frente a tinciones de tricrómico de Masson (Fig. 9). La tinción de hematoxilina/eosina se diferencia principalmente de teñir la fibrina en un tono rosa; el tricrómico de Masson por el contrario tiñe las fibras de colágeno y tejido conjuntivo de verde, lo cual es interesante para detectar zonas de osificación.

En los cortes, se buscan mostrar los orígenes de los procesos de osificación. Sin embargo, o el resultado siguiendo el protocolo habitual de tiempos de esta tinción, da un tono demasiado azul para el mesénquima que enmascara a las otras tinciones. Es por ello que se ajustan los tiempos para obtener un tono más apropiado de la tinción tricrómica de Masson. Además, al no observarse procesos de osificación en este estadio se opta por estudiar a los embriones de mayor desarrollo.



**Figura 9.** Tinciones de Hematoxilina/Eosina (A y B) de embriones completos de pollo de st 22 aumento x2 al microscópio óptico, frente a tinciones de tricrómico de Masson de embriones completos st 28 en un corte con aumento x2. En los cortes C y D, se busca mostrar los orígenes de los procesos de osificación, pero nuestro resultado, siguiendo el protocolo habitual de tiempos de esta tinción, resulta en un tono demasiado azul para el mesénquima que enmascara a las otras tinciones. No se observan procesos de osificación en este estadio, por tanto, se estudiarán a los embriones de mayor desarrollo (st 31-34).

Estas modificaciones principales para la tinción tricrómica de Masson adaptada para los embriones de pollo de estadios a partir de 30, consistieron en reducir ligeramente los tiempos de la Hematoxilina de Weigert (30 segundos); reducir la Fucsina más Ponceau (cuatro minutos) y dar un tiempo para el Verde Luz de 4 minutos y 30 segundos (Fig.10).

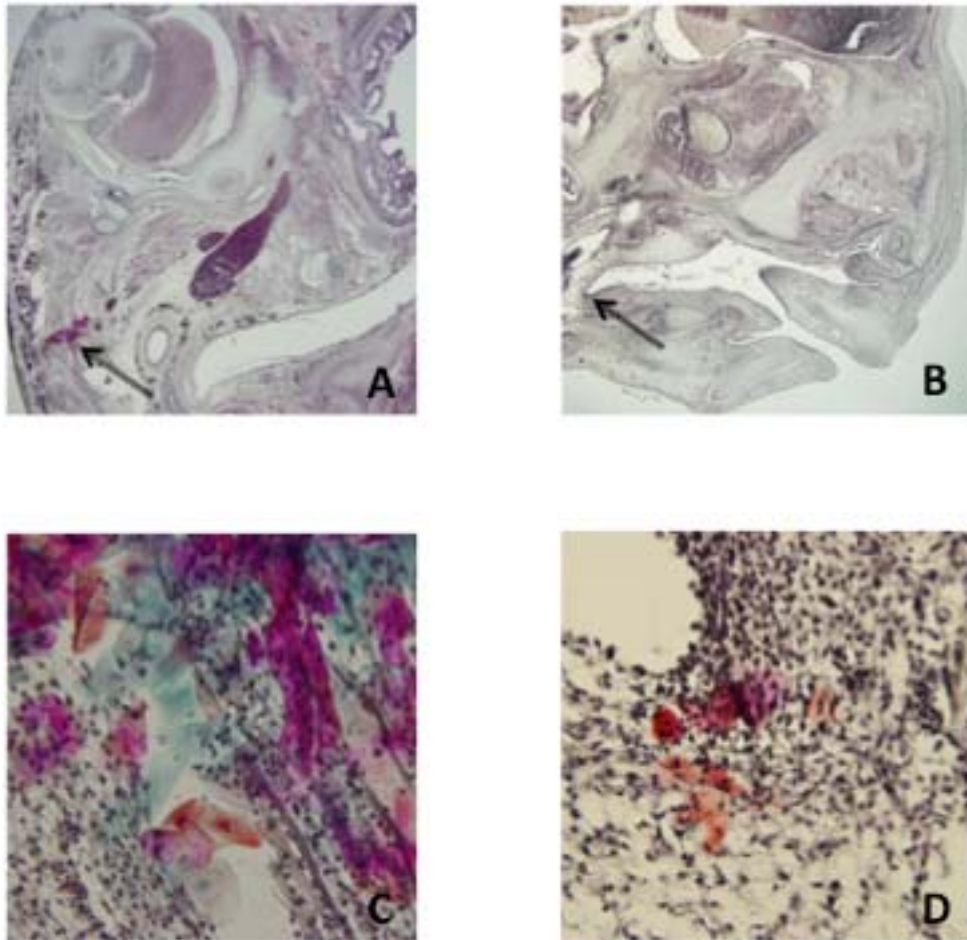


**Figura 10.** Tinción histológica de Tricrómico de Masson con los tiempos ajustados en un embrión st 34. La imagen muestra el área maxilar con la osificación del cartílago de Meckel (B). Las flechas señalan los tonos correctos de las diferentes estructuras teñidas al aplicar la tinción tricrómica de Masson. La queratina, glóbulos rojos y el tejido muscular se tiñen de rojo (A); las fibras de colágeno y tejido conjuntivo se tiñen de verde (B) y los núcleos celulares de lila o marrón (C). Las fibras de colágeno y tejido conjuntivo participan en los procesos de osificación por lo que la aparición de tinciones verde destaca estos procesos en los cortes histológicos.

Una vez obtenido un protocolo de tinción adecuado, se intentaron localizar restos del material injertado dentro del área donde fue colocado en embriones experimentales y controles.

En el caso del embrión al que se le colocó BMP-2 con quitina, se aisló un corte donde puede apreciarse cómo la BMP-2 ha provocado la aparición de un tejido que se tiñe positivamente de verde por la presencia de colágeno. Es posible que, en este caso, la BMP-2 haya inducido a las células mesenquimales a diferenciarse a fenotipo osteoblástico y a sintetizar matriz osteoide (Fig.11). En el embrión control al que se le puso solamente quitina, se observa el material sin provocar ningún tipo de respuesta al huésped.

Además, no observamos otras alteraciones morfológicas ni teratogénicas tras la implantación de BMP-2. Este resultado es esperanzador para continuar en esta línea, siendo necesario ajustar las dosis y el método de manipulación y así obtener buenos resultados *in vivo*.



**Figura 11.** Cortes histológicos del embrión con BMP-2 y quitina a una magnificación x2 en la zona de cabeza y cuello (A) y corte con magnificación x2 del embrión con únicamente quitina (B). Las flechas en A y B señalan la localización del material implantado. Los cortes C y D son las magnificaciones x50 del área con el material injertado. En C, se observa el inicio de la formación de hueso ectópico (teñido en verde) por la acción de la BMP-2. Este resultado no se observa en el control con únicamente quitina (D). En una observación global de los embriones no detectamos efectos teratogénicos y/o malformaciones adicionales en ambos grupos.

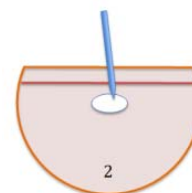
## 5.2- Efecto de la implantación de quitina con BMP-2 en el mesénquima del embrión.

Para este experimento, se modificó el protocolo de operación con la intención de que el material esté en íntimo contacto con las estructuras que se desean estudiar. Por el contrario, en el método anterior no controlábamos la posición exacta de la colocación del material. El método de la operación se describe a continuación.

En primer lugar, se realizó la apertura del huevo para exponer al embrión. Con ayuda de la magnificación con lupa, se opera al embrión rasgando el saco amniótico con instrumentos de tungsteno y se coloca el material en un “bolsillo” que se practica cerca de la zona del primer arco branquial. El material se introduce en la zona mediante capilares de vidrio.

Se dividieron los embriones en cuatro grupos: control de apertura del huevo, control de la operación del embrión sin añadir el material, control con quitina y por último, grupo experimental con operación y colocación de la BMP-2 con quitina. Las muestras se recogieron a las 24 horas de incubación (Tabla 4).

Sujeto	Condición	Estadio Operación	Tiempo incubación	Estadio Esperado	Estadio Recogida	Supervivencia operación	Estado Embrión en la recogida
1	Control apertura in ovo	26	24h	28	28*	Si	Vivo
2	Control apertura in ovo	26	24h	28	26	No	Muerto (Sin latido)
3	Control apertura in ovo	26	24h	28	28	Si	Vivo
4	Control apertura in ovo	26	24h	28	26	No	Muerto (Contaminación)
1	Control operación	26	24h	28	26	No	Muerto (Sin latido)
2	Control operación	26	24h	28	29	Si	Vivo
3	Control operación	26	24h	28	26	No	Muerto (Sin latido)
1	Control quitina	26	24h	28	28	Si	Muerto (Sin latido)
2	Control quitina	26	24h	28	28*	Si	Vivo
1	BMP-2 y quitina	26	24h	28	26*	Si	Muerto (Sin latido)
2	BMP-2 y quitina	26	24h	28	28	Si	Muerto (Sin latido)



**Tabla 4.** Resultados tras utilizar el segundo método descrito para la implantación de las micropartículas de quitina y BMP-2. 11 embriones en total fueron recogidos tras 24 horas después de la cirugía, de los cuales sobrevivieron dos tras la operación, uno del grupo control de operación y el último del grupo control de la quitina.

En este caso, consideramos que esta operación no mejora la supervivencia (ver Tabla 6 más adelante). Aunque hemos observado un porcentaje similar de embriones desarrollados tras la operación, tan sólo se consiguió que dos embriones se encontraran vivos (y con latido cardíaco perceptible) tras 24 horas después de la cirugía. La manipulación es más complicada, ya que es fácil romper vasos sanguíneos que rodean al embrión, comprometiendo su supervivencia.

Estos embriones se incluyeron en parafina mediante el método descrito, quedando pendiente su examen histológico para etapas posteriores de la Tesis Doctoral.

### 5.3- Efecto de la implantación de quitina con BMP-2 realizando una apertura en la membrana amniótica.

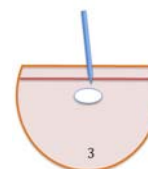
Al observarse la baja supervivencia del anterior ensayo, se modifica el protocolo a un método de operación menos cruento, en el que solamente se abría el saco amniótico y

se introducía el material directamente sobre el mesénquima del embrión para evitar el mínimo de hemorragias posibles por la manipulación.

Los embriones se dividieron en dos grupos, control con quitina y experimental con BMP-2 y quitina, con tres embriones en cada grupo. Además, se dejaron incubar durante más tiempo, cuatro días tras la cirugía.

Como resultado, podemos observar como los seis embriones se encontraron muertos tras un periodo de cuatro días de incubación (Tabla 5). Dos de ellos, uno de cada grupo respectivamente, llegaron a desarrollarse tras la cirugía, mientras que el resto no mostraban signos de desarrollo alguno. En este caso fue posible encontrar un embrión con un aspecto similar al fenotipo de muerte por edema. Igualmente, queda pendiente su examen histológico para etapas posteriores de la Tesis Doctoral.

Sujeto	Condición	Estadio Operación	Tiempo incubación	Estadio Esperado	Estadio Recogida	Supervivencia operación	Estado Embrión en la recogida
1	Control quitina	28	96h	35	28*	Si	Muerto (Contaminación)
2	Control quitina	28	96h	35	28	No	Muerto (Contaminación)
3	Control quitina	28	96h	35	28	No	Muerto (Sin latido)
1	BMP-2 y quitina	28	96h	35	31	Si	Muerto (Edema)
2	BMP-2 y quitina	28	96h	35	28	No	Muerto (Contaminación)
3	BMP-2 y quitina	28	96h	35	28	No	Muerto (Sin latido)



**Tabla 5.** Resultados tras utilizar el tercer método descrito para la implantación de las micropartículas de quitina y BMP-2. En este caso, se realiza una incisión en la membrana amniótica para introducir el material sobre el embrión. Se distribuyen dos grupos y tienen un periodo de incubación de cuatro días.

Observando los porcentajes de supervivencia a la operación, se ha observado que los intentos de mejorar la administración de BMP-2 intentando conseguir un contacto más íntimo con el mesénquima embrionario no han resultado exitosos (Tabla 6). Es necesario señalar que la operación *in ovo* es muy delicada, siendo necesario encontrar un equilibrio en conseguir una exactitud en la implantación del material a la vez que se procura no afectar al resto de estructuras implicadas en el desarrollo del embrión completo.

% Supervivencia a la operación		
Operación 1	75%	6/8
Operación 2	71,4%	5/7
Operación 3	33,3%	2/6

**Tabla 6.** Supervivencia a los tres métodos operatorios, presentando el dato en porcentaje y mostrando el número de embriones totales.

% Muertes por edema asociadas a BMP-2		
Operación 1	50%	2/4
Operación 2	0%	0/2
Operación 3	33,3%	1/3

**Tabla 7.** Porcentaje de muertes por edema dentro de los grupos tratados con BMP-2 y quitina.

De manera preliminar, hemos calculado el porcentaje de muertes por edema posiblemente provocadas por la adición de BMP-2. Con estos datos y la bibliografía existente (Deckers *et al* , 2002; Li *et al* , 2005; Fiedler *et al* , 2002), se considera interesante explorar este aspecto en futuros experimentos realizados en este modelo.

## **DISCUSIÓN.**

# 6-DISCUSIÓN.

## 6.1 Diferenciación temprana de tejido óseo en el proceso mandibular por acción de la BMP-2.

La embriogénesis en pollo implica procesos de desarrollo equivalentes a los que ocurren en los mamíferos, pero se llevan a cabo a una velocidad superior (Zareen 2011). Como se ha citado en la introducción, la BMP-2 y la BMP-4 desempeñan papeles importantes en las interacciones epitelio-mesenquimales durante el desarrollo embrionario (Lyons *et al* , 1990;. Jones *et al* , 1991; Vainio y col, 1993; Bitgood y McMahon 1995;. Phippard *et al* , 1996). Estas proteínas están involucradas en la inducción del mesodermo y ectodermo neural (Jones *et al* , 1992, Hawley *et al* , 1995; Liem *et al* , 1995), y, junto con otros factores de crecimiento, regulan el destino de las células de la cresta neural y sus derivados (Hall y Ekanayake, 1991; Reissmann *et al* , 1996; Shah *et al* , 1996).

En nuestros experimentos hemos podido observar como la adición de BMP-2 exógena al mesénquima embrionario es capaz de inducir diferenciación celular a fenotipo óseo, presentando una tinción positiva para colágeno de manera ipsilateral al material implantado. En adición, también hemos podido apreciar como el plan de morfogénesis embrionario se ha visto afectado, tanto por la propia cirugía como por una posible acción colateral de la BMP-2 en otros mecanismos. Sin embargo, es necesario señalar que no podemos identificar un efecto directo en la aparición de malformaciones específicas en el embrión, siendo necesario continuar nuestro análisis para poder llegar a una conclusión clara.

Además, creemos que la administración de quitina sin BMP-2 no ha provocado ningún efecto claro en el desarrollo embrionario, encontrándose esta observación en concordancia con numerosas evidencias bibliográficas que describen la biocompatibilidad de este material (Whisteler *et al* , 1983; Yalpani *et al* , 1992; Nakijama *et al* , 1984).

Estudios de distribución en tejidos mostraron que múltiples BMPs (BMP-2, -4, -5, y -7) se expresan en el epitelio del arco mandibular (Francis-West *et al* , 1994; Pared y Hogan, 1995; Aberg *et al* , 1997; Barlow y Francis-West, 1997; Tucker *et al* , 1998a;. Wang *et al* , 1998b, 1999;. Solloway y Robertson, 1999). En etapas tempranas, la expresión de BMP-4 y BMP-5 está restringida al epitelio de la región medial que recubre el mesénquima que expresa Msx1 y Msx2. En contraste con los patrones de restricción de la expresión de estas BMPs, BMP-2 y BMP-7 se expresan en un dominio más amplio en todo el epitelio de los arcos branquiales.

Se encuentra documentado que las BMP-2, -4 y-7 son capaces de mantener la proliferación celular y la expresión de Msx en el mesénquima mandibular medial (Barlow y Francis-West 1997; Wang *et al* , 1998b, 1999). Cuando se coloca de manera lateral, las BMPs inducen proliferación celular y la expresión ectópica de Msx en el

mesénquima lateral mandibular (Barlow and Francis-West, 1997; Wang *et al* , 1998b, 1999).

Nuestra intención es reproducir estos efectos con nuestro protocolo de operación, y comprobar la activación de la cascada de señalización a diferenciación ósea. Además de obtener mejores resultados en cuanto a supervivencia embrionaria, queremos comprobar la expresión de los genes diana de la BMP-2 mediante técnicas de biología molecular para asegurar la activación de la ruta de diferenciación ósea.

Una mayor comprensión de los papeles de las BMPs en la elongación y la morfogénesis de la mandíbula en desarrollo proviene de estudios en el que las BMPs se implantan in vivo en diferentes fases y en diversas regiones del desarrollo de la mandíbula del pollo (Barlow y Francis-West, 1997; Ekanayake y Hall, 1997; Wang *et al* , 1999; Mina *et al* 2002).

Se ha comprobado en estudios previos que en el estadio 23, las BMPs colocadas lateralmente o medialmente no contribuyen a la elongación del mesénquima mandibular o del cartílago de Meckel (Wang *et al* ., 1999). La aplicación de BMP-2, BMP-4, BMP-7 en la región lateral de la mandíbula de un embrión de pollo en estadio 23 no afectó al crecimiento de la mesénquima mandibular aunque alteró la morfología y los patrones de los elementos esqueléticos en la región caudal (articulación de la mandíbula) en la parte implantada.

En contraste con sus efectos en el estadio 23, la implantación in vivo de esferas empapadas en concentraciones similares de BMPs en la región lateral de las mandíbulas en estadios 20/22 ejerce efectos negativos, lo que resulta en la reducción del crecimiento del proceso mandibular y la pérdida completa de cartílago articular de Meckel y los elementos articulares del lado cercano al implante (Barlow y Francis-West, 1997; Ekanayake y Hall, 1997; Mina *et al* , 2002).

Por otra parte, la implantación de esferas empapadas en BMPs en una posición más medial (más cerca del mesénquima que expresa Msx en la región medial) respecto a las mandíbulas de estadio 20/22, indujo la formación de una derivación adicional del cuerpo de cartílago de Meckel (Barlow y Francis-West, 1997, Mina *et al* , 2002).

El análisis de estos datos indica que el mesénquima mandibular del embrión de pollo de diferentes regiones (lateral vs medial) en diferentes etapas (20 vs 23) responde de manera diferente a la acción de las BMPs.

En nuestros experimentos, no hemos observado una alteración clara en el crecimiento del arco mandibular, posiblemente debido a trabajar con un estadio más avanzado (estadio 26) del desarrollo embrionario.

En contraste con lo observado en las mandíbulas de pollo, un estudio reciente demostró que la aplicación de BMP-2 durante 6 días en la región lateral de las mandíbulas de ratones (E10), se observaba la inducción de cartílago ectópico. Sin embargo, no se ha visto este resultado en la región medial (Semba *et al* , 2000).

Los patrones superpuestos de expresión de las BMPs en el epitelio mandibular y las similitudes entre los efectos de las BMPs en el mesénquima mandibular sugieren papeles de cooperación o redundantes para este factor en las cascadas de señalización que median las interacciones epitelio-mesénquima que regulan el desarrollo y la morfogénesis de la mandíbula. Sin embargo, los papeles de las BMPs en desarrollo del arco mandibular siguen sin estar completamente definidos en modelos murinos.

Por un lado, la formación de una extensión ectópica del cuerpo del cartílago de Meckel después de la implantación de esferas de BMP a la región medial en la etapa 20/22 sugiere que las BMPs, a través de sus interacciones con genes diana tales como *Msx1* y *Msx2*, pueden estar involucradas en la extensión y la morfogénesis de la punta de la mandíbula en desarrollo.

Las anomalías fenotípicas en el ratón doble KO para *Bmp-5/Bmp-7* (Solloway y Robertson, 1999) proporcionaron la evidencia directa de la participación de estos factores en el desarrollo de la arcada mandibular. Estos mutantes muestran anomalías en muchos órganos en los que son co-expresados *BMP5* y *Bmp7*, incluyendo el primer arco branquial (Solloway y Robertson, 1999, como un menor tamaño del mismo debido a una desregulación de la apoptosis (Solloway y Robertson, 1999). Además, otros factores de crecimiento pueden actuar cooperativamente con las BMPs para promover la extensión dirigida del mesénquima mandibular.

## **6.2- El exceso de BMP-2 puede provocar muerte por edema.**

En nuestro estudio, hemos observado que ciertos sujetos experimentales presentaban hemorragia interna, y pensamos que uno de los motivos se debe a la sobredosis de BMP-2.

Las BMPs inducen también la expresión y secreción de factores de crecimiento vasculares endoteliales  $\alpha$  (VEGF- $\alpha$ ). En los osteoblastos, este factor juega un papel importante en el acoplamiento de la formación de hueso y de la angiogénesis, actuando como un quimioatrayente para células vecinas endoteliales (Deckers *et al* , 2002; Li *et al* , 2005; Fiedler *et al* , 2002).

Otro motivo que puedan producirse estas hemorragias es la manipulación del embrión, ya que hemos observado que una pequeña cantidad de sangrado durante la intervención que puede causar la muerte. Es necesario tener mucho cuidado para no dañar el corazón y los vasos sanguíneos principales que se encuentran en la proximidad de la zona de la mandíbula en desarrollo (Ekanayake *et al* , 1997). Para descartar este aspecto, se explorarán estos resultados en experimentos posteriores de la realización de la futura Tesis Doctoral.

### 6.3- Técnicas de operación y resultados obtenidos.

Hemos realizado tres tipos de ensayos experimentales para optimizar un protocolo de operación para la implantación de quitina con BMP2 capaz de conseguir una supervivencia de los embriones cercana al 100%.

En nuestra primera aproximación, tras romper la cáscara del huevo se colocó un exceso de material sobre el área tisular cercana al primer arco branquial sobre la membrana amniótica, sin un control certero de la localización o de la cantidad exacta depositada.

Podemos considerar éste método como el más conservador, ya que no se realiza ninguna incisión en el saco amniótico ni en el mesénquima del embrión. Igualmente, obtuvimos un número reducido de embriones vivos al terminar el tiempo de incubación. Esto sea posiblemente debido a dos factores: en primer lugar, la inexperiencia en la manipulación embrionaria y los posibles errores experimentales que conlleva; en segundo lugar, la propia acción de la BMP-2 sobre el desarrollo embrionario (50% de muertes por posible hemorragia interna).

La falta de dosificación podría ser un factor importante para las muertes por hemorragia interna. La BMP-2 induce también la expresión y secreción de factores de crecimiento vasculares endoteliales  $\alpha$  (VEGF- $\alpha$ ). Es posible que hayamos afectado a un proceso clave en el desarrollo vascular (quizá la regulación de la muerte celular asociada al desarrollo), interrumpiendo o alterando la morfogénesis más allá de nuestro objetivo. Al no controlar en algunas ocasiones la posición exacta del material, creemos que la BMP pudo alterar la diferenciación de otros tipos celulares en estructuras cercanas a la zona cefálica.

En el segundo experimento, buscamos un control más certero de la dosis y de la localización del material. Para ello, aparte de la apertura de la cáscara, realizamos dos incisiones para introducir una cantidad determinada de material en un lugar específico del proceso mandibular y evitar daños tisulares colaterales.

La primera incisión es en el saco amniótico, seguida de realizar otra incisión en el mesénquima del primer arco para introducir el material mediante la técnica del “bolsillo” o “sobre”. Como inconveniente, destacamos que el embrión se desplazaba al notar el contacto de los instrumentos, además de hundirse en la clara al estar en suspensión. Al no tener desarrollado el sistema nervioso no perciben dolor, pero ante el estímulo de contacto el embrión se mueve y dificulta operar con precisión.

Otra dificultad añadida es la gran vascularización de la zona, pues aparte de la proximidad del tubo cardíaco en desarrollo, también se cruzan vasos principales que mantienen el soporte vital del embrión. La manipulación debe ser muy delicada pues a la mínima hemorragia que suceda, ésta provoca la muerte del organismo. Igualmente, la sangre enturbia la clara y el líquido amniótico, y dificulta la visión durante la intervención (Ekanayake *et al*, 1997).

Una dificultad añadida más fue la colocación del material, de una consistencia granulosa. Al entrar en contacto con la clara del huevo, éste se dispersaba y no se controlaba la posición exacta en la que se colocaba.

Como vimos la dificultad que entrañaba la operación, decidimos restringir el tiempo de desarrollo a 24 horas para valorar su supervivencia. Como se ha visto, el número de embriones que progresaban tras la operación es similar, aunque no se ha mejorado el número de embriones que llegaban vivos a la recogida de muestras. La valoración de si el material entró en contacto con nuestra zona de interés y produjo osificación será evaluada por histología, que en estos momentos se encuentra en proceso de desarrollo.

En el tercer experimento, se tomó la decisión de eliminar una incisión para limitar el número de hemorragias posibles. El procedimiento se basó únicamente en la incisión del saco amniótico y la colocación del material sin bolsillo, para ver si por proximidad ocurrían fenómenos similares a los del primer experimento.

En este caso decidimos extender el período de incubación a 4 días. Sin embargo, únicamente un sujeto del grupo experimental muestra haberse desarrollado en comparación al resto, siendo posible afirmar que tampoco hemos mejorado el protocolo de cirugía.

Para facilitar la operación y así evitar las complicaciones encontradas en las anteriores experiencias, estamos valorando realizar la cirugía en embriones cultivados fuera del huevo. Para ello, hemos tenido en cuenta la posibilidad de realizar la extracción temprana del embrión y su cultivo en placa en un medio semisólido (Método EC; Chapman *et al* , 1993), un método clásico y con una gran tradición en el estudio del desarrollo temprano del embrión de pollo.

Sin embargo, teniendo en cuenta los estadios avanzados en los que se plantea este estudio, el método *shell-less* parece más apropiado. Este método, similar al descrito anteriormente, permite la observación continua de los embriones de pollo vivos desde el día 3 al día 18 de la incubación. De la misma manera, podríamos observar la diferenciación de los sistemas de órganos y estructuras extraembrionarias así como el comportamiento antes de la eclosión.

Los primeros intentos de cultivar embriones de pollo fuera de sus cáscaras (Boone, 1963; Quisenberry y Dillon, 1962) tuvieron un éxito limitado. Bruce Dunn (1974), un estudiante de secundaria, ideó un método para el cultivo de embriones de pollo en eslingas de plástico. Trabajando con Boone y Ramsey y Dunn mejoraron el método de cultivo de embriones *ex ovo* (Dunn y Boone, 1976; Ramsey y Boone, 1972).

Las aplicaciones de este tipo de cultivo van desde el estudio de la biología del desarrollo, estudios orientados a proyectos de crecimiento (Dunn y Boone, 1976), teratología (Pearson *et al* , 1983), el metabolismo de calcio (Burke *et al* , 1979; Dunn *et al* , 1981; Narbaitz, 1979; Narbaitz y Jande, 1978; Tuan, 1980), la angiogénesis (Castellot *et al* 1986; Dobson *et al* , 1990; Sherer y Dostal, 1982), o la osteogénesis.

Castellot y col (1982) simplificó el método aún más sustituyendo tazas calientes desechables ("chick-in-a-cup") por trípodes de plástico. Desde la publicación de Dunn de su método en 1974, este método ha servido como modelo experimental para la investigación científica. La simplicidad, adaptabilidad, y la elegancia de este método hacen que sea una opción atractiva que será explorada en fases posteriores de la Tesis Doctoral.

#### **6.4- Futuros experimentos**

Los experimentos realizados en este Trabajo de Fin de Máster han conseguido poner a punto en nuestro laboratorio la utilización de un nuevo modelo de experimentación animal: el embrión de pollo.

El análisis de la acción de la BMP2 requiere una profundización a nivel celular y molecular necesaria para futuras aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos. De esta manera, se hace imprescindible describir el efecto global en el organismo a partir de la implantación local de un factor de crecimiento, ya que pueden existir consecuencias no esperadas. La entrada en el corriente sanguíneo puede hacer que nuestro factor actúe sobre dianas tisulares muy alejadas de la zona sometida a operación.

En el embrión de pollo, al ser un organismo en desarrollo aislado e independiente de la madre, es posible observar la acción de nuestro factor en tejido embrionario no especializado y además, valorar el posible efecto en el organismo completo. Esta cuestión resulta relevante cuando nos planteamos el efecto que puede tener un implante dental con un factor de crecimiento (como la BMP-2) en mujeres embarazadas. El transporte a través de la barrera placentaria es un mecanismo activo capaz de adecuarse a las necesidades del feto, de manera que cualquier elemento extraño presente en el torrente sanguíneo puede convertirse en tóxico para el organismo en desarrollo. Igualmente, describir el efecto de la BMP-2 en estos estadios tempranos puede ayudar a describir el origen de diferentes enfermedades prenatales con problemas en osificación. Por todo ello, consideramos que el estudio embrionario complementa los análisis realizados en organismos adultos.

Como futuros experimentos siguiendo este método de trabajo, nos planteamos varios posibles abordajes. Por un lado, probaremos diversos vehículos para el factor de crecimiento escogido, como puede ser el quitosano (derivado de la quitina) o incluso hidrogeles basados en la vinilpirrolidona con objeto de evaluar su biocompatibilidad y realizar un estudio de la liberación de factores al tejido embrionario. Así, debemos encontrar el vehículo ideal capaz de satisfacer nuestra demanda: no tóxico, capaz de absorber y liberar nuestro factor de interés y con unas características mecánicas apropiadas que permitan su manipulación.

De la misma manera, queremos también variar la concentración del factor empleado, con objeto de confeccionar un experimento dosis-respuesta capaz de ilustrar cual

puede ser la concentración óptima para provocar diferenciación ósea sin dañar al resto del organismo, y evitar así las muertes observadas por edema.

Si se considera oportuno, la familia de la BMP presenta otros factores cuyo efecto es necesario revisar en la osificación temprana del proceso mandibular. Dentro de ésta posible línea, estudiar el efecto de la BMP-4, de la BMP-7 (o una combinación de las mismas) puede resultar de interés en nuestro análisis.

En la futura Tesis Doctoral, resultaría necesario comprobar los efectos observados en el embrión de pollo con otros modelos animales. Así, puede ser posible trabajar con la mandíbula de cerdo u oveja en modelos de resección de un fragmento de la misma. Estos mismos datos pueden ser extrapolados al diseño o síntesis de diversos recubrimientos para implantes dentales con objeto de favorecer la integración ósea.

## 7-CONCLUSIONES.

- 1- Con los métodos de cirugía actuales en este estudio, consideramos que ninguno de los métodos explicados consigue una supervivencia óptima del embrión a la operación.
- 2- Se ha logrado mejorar el protocolo de tinción histológica para embriones de pollo de estadio 31 y estadio 34.
- 3- Se ha demostrado que las micropartículas de quitina son biocompatibles con el desarrollo embriológico y no se ha encontrado efectos teratogénicos causados por los mismos.
- 4- Hemos visto que la implantación de BMP en el tejido mesenquimático en estadio 26 no destinado a la formación de hueso mandibular, responde a la señal de BMP y provoca la diferenciación a tejido de fenotipo osteoblástico.

## **8-BIBLIOGRAFÍA.**

Abarrategi A, Moreno-Vicente C, Martínez-Vázquez FJ, Civantos A, Ramos V, Sanz-Casado JV, Martínez-Corriá R, Perera FH, Mulero F, Pedro Miranda P, López-Lacomba JL. Biological Properties of Solid Free Form Designed Ceramic Scaffolds with BMP-2: In Vitro and In Vivo Evaluation. PLoS ONE. 2012; 7(3): e34117

Aberg T, Wozney J, Thesleff I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. Dev Dyn. 1997; 210:383-396.

Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. Coming to grips with integrin binding to ligands. Curr Opin Cell Biol 2002;14:641–51.

Barlow AJ, Francis-West PH. Ectopic application of recombinant BMP-2 and BMP-4 can change patterning of developing chick facial primordia. Development 1997; 124:391-398.

Berton G, Lowell CA. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. Cell Signal 1999;11:621.

Bitgood, M.J. and McMahon, AP. Hedgehog and BMP genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo Dev. Biol. 1995; 172: 126-138.

Boone, M. A. A method of growing chick embryos in vitro. Poultry Science. 1963; 42:916–921.

Bränemark PI. Osseointegration and its experimental studies. J Prosthet Dent 1983;50:399–410.

Bränemark PI. Vital microscopy of bone marrow in rabbit. Scand J Clin Lab Invest 1959;11(Suppl 38):1–82.

Burke, B. R., R. Narbaitz, and S. Tolnaiz. Abnormal characteristics of blood from chick embryos maintained in shell-less culture. Revue Canadienne de Biologie. 1979; 63-66.

Busch C, Krochmann J, Drews U. The chick embryo as an experimental system for melanoma cell invasion. PLoS One. 2013;8(1).

Castellot, J. J., Jr., A. M. Kambe, D. E. Dobson, and D. M. Spiegelman. Heparin potentiation of 3-T-3-adipocyte stimulated angiogenesis: Mechanism of actions on endothelial cells. Journal of Cell Physiology. 1986; 127:323–329.

Castellot, J. J., Jr., M. T. Karnovsky, and B. M. Spiegelman. Differentiation-dependent stimulation of neo-vascularization and endothelial cell chemotaxis by 3-T-3-adipocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1982; 79:5597–5601.

Champagne CM, Takebe J, Offenbacher S, et al. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. Bone 2002; 30:26.

Chapman SC, Collignon J, Schoenwolf GC, Lumsden A. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev Dyn*. 2001; 220:284-289

Chiu-Jou Wu, Hsein-Kun Lu. Smad signal pathway in BMP-2-induced osteogenesis a mini review. *J Dent Sci* 2008; 3(1):13–21.

Couly GF, Coltey PM, Le Douarin NM. The developmental fate of the cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Development*. 1992; 114:1-15.

Couly GF, Coltey PM, Le Douarin NM. The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development*. 1993; 117:409-429.

Couly G, Grapin-Botton A, Coltey P, Le Douarin NM. The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revisited: the regenerating cells originate from the contralateral or from the anterior and posterior neural fold. *Development*. 1996; 122:3393-3407.

Couly G, Grapin-Botton A, Coltey P, Ruhin B, Le Douarin NM. Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between Hox gene expression and lower jaw development. *Development*. 1998; 125:3445-3459.

Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG. *Nat. Med.* 1 (1995) 1322–1324.

Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor B1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:11740–4.

Davies J, Hosseini MM. Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies JE, editor. *Bone engineering*. Toronto (Ontario): Em squared; 2000. p. 1.

Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002;143(4):1545–53.

Dobson, D. E., A. M. Kambe, E. Block, T. Dion, H. Lu, J. J. Castellot, Jr., and D. M. Spiegelman. 1-Butyryl-glycerol: A novel angiogenesis factor secreted by differentiating adipocytes. *Cell*. 1990; 61:223–230.

Dunn, B. E., and M. A. Boone. Growth of the chick embryo in vitro. *Poultry Science*. 1976; 55:1967–1981.

Dunn, B. E., T. P. Fitzharris, and B. D. Barnett. Effects of varying chamber construction and embryo pre-incubation age on survival and growth of chick embryos in shell-less culture. *The Anatomical Record*. 1981; 199:33–43.

Dunn, B. E., J. S. Graves, and T. P. Fitzharris. Active calcium transport in the chick chorioallantoic membrane requires interaction with the shell membranes and/or shell calcium. *Developmental Biology*. 1981; 88:259–268.

Edwards RG. A burgeoning science of embryological genetics demands a modern ethics. *Reprod Biomed Online*. 2007 Sep; 15Suppl 1:34-40.

Ekanayake S, Hall BK. The in vivo and in vitro effects of bone morphogenetic protein-2 on the development of the chick mandible. *Int J Dev Biol*. 1997; 41:67-81.

Fiedler J, Rödler G, Günther KP, et al. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 2002;87:305–12.

Francis-West PH, Tatla T, Brickell PM. Expression patterns of the bone morphogenetic protein genes *Bmp-4* and *Bmp-2* in the developing chick face suggest a role in outgrowth of the primordia. *Dev Dyn*. 1994; 201:168-178.

Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, et al. A role of osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 1991;45:1.

Gong P, Yang YP, Yang Y, Feng YP, Li SJ, Peng XL, Gong YZ. Different gene transfer methods at the very early, early, late and whole embryonic stages in chicken. *Acta Biol Hung*. 2012 Dec;63(4):453-62.

Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. *J. Bone Joint Surg. Am.* 83 (2001) 98–103.

Hacker A, Guthrie S. A distinct developmental programme for the cranial paraxial mesoderm in the chick embryo. *Development*. 1998; 125:3461-3472.

Hackman RH. Chitin 3. Adsorption of Protein to Chitin. *Aust J Biol Sci*. 1955; 8, 530-536.

Hackman RH. Y Goldberg M. *J Insect Physiol*. 1958; 2, 221.

Hackman RH. *Aust J Biol Sci*. 1960; 13, 598

Hall, B.K. *Developmental and Cellular Skeletal Biology*. Academic Press, New York. 1978.

Hall, B.K. Tissue interactions in the development and evolution of the vertebrate head. In *Developmental and Evolutionary Aspects of the Neural Crest* (ED. P.F.A Maderson). Wiley Interscience, New York. 1987b; pp. 215-259.

Hall, B.K. The embryonic development of bone. *Am. Sci.* 1988a; 76: 174-181.

Hall BK, Coffin-Collins PA. Reciprocal interactions between epithelium, mesenchyme, and epidermal growth factor (EGF) in the regulation of mandibular mitotic activity in the embryonic chick. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1990; 10:241-261.

Hall, B.K. and Ekanayake, S. Effects of growth factors on the differentiation of neural crest cells and neural crest cell-derivatives. *Int. J. Dent. Biol.* 1991; 35: 367- 387.

Hall BK. Embryonic bone formation with special reference to epithelial-mesenchymal Interactions and growth factors. In *Bone, Volume 8: Mechanisms of Bone Development and Growth*, CRC Press, Boca Raton. 1994; pp. 137-192.

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn.* 1992 Dec;195(4):231-72.

Hawley, SH.B., Wünnenberg-Stapleton, K., Hashimoto, C., Laurent, M.N, Watabe, T., Blumberg, BW. and Cho, KW.Y. Disruption of BMP signals in embryonic *Xenopus* ectoderm leads to direct neural induction. *Genes Dev.* 1995; 9: 2923-2935.

Hollister MC, Weintraub JA. The association of oral status with systemic health, quality of life, and economic productivity. *J Dent Educ* 1993;57(12):901–12.

Horstadius S, Sellman S. Experimentelle Untersuchungen über die Determination des knorpeligen Kopfskelettes bei Urodelen. *Nov Act Reg Soc Scient Ups (Ser IV).* 1946; 13:1-170.

Hunt P, Gulisano M, Cook M, Sham MH, Faiella A, Wilkinson D, et al. A distinct Hox code for the branchial region of the vertebrate head. *Nature.* 1991a; 353:861-864.

Hunt P, Wilkinson D, Krumlauf R. Patterning the vertebrate head: murine Hox 2 genes mark distinct subpopulations of premigratory and migrating cranial neural crest. *Development.* 1991b; 112:43-50.

Hunt P, Clarke JD, Buxton P, Ferretti P, Thorogood P. Stability and plasticity of neural crest patterning and branchial arch Hox code after extensive cephalic crest rotation. *Dev Biol.* 1998; 198:82-104.

Hunt S. Polysaccharide-Protein Complexes in Invertebrates. (Academic Press, Londres, 1970) p.129.

Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. *Clin. Oral Implants Res.* 17 (2006) 579–586.

Jeuniaux C. *Arch Int Physiol Biochem.* 1959; 67, 516.

Jiang X, *Int. J. Prosthodont.* 25 (2012) 132–134.

Jones C.M, Lyons, K.M and Hogan, B.L.M. involvement of bone morphogenetic proteína-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogénesis in the Mouse. *Development*. 1991; 111:531-542.

Jones. C.M., Lyons. K.M., Lapan. P.M., Wright, C. V. E, and Hogan. B.L.M. DVR-4(bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. *Development*. 1992; 115: 639-647.

Kontges G, Lumsden A. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development*. 1996; 122:3229-3242.

Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell*. 1994; 78:191-201.

Le Douarin NM, Dupin E, Ziller C. Genetic and epigenetic control in neural crest development. *Curr Opin Genet Dev*. 1994; 4:685-695.

Le Douarin NM, Catala M, Batini C. Embryonic neural chimeras in the study of vertebrate brain and head development. *Int Rev Cytol*. 1997; 175:241-309.

Li G, Cui Y, McIlmurray L, et al. rhBMP-2, rhVEGF165, rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res* 2005;23:680–5.

Liem, K.F.. Tremmi, G., Roelink, H. and Jessell, T.M. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*. 1995; 82: 969-979.

Limura T, Pourquié O. Manipulation and electroporation of the avian segmental plate and somites in vitro. *Methods Cell Biol*. 2008;87:257-70.

Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998;19:2219–32.

López-Morales Y, Abarrategi A, Ramos V, Moreno-Vicente C, López-Durán L, López-Lacomba JL and Marco F. In vivo comparison of the effects of rhBmp-2 and rhBmp-4 in osteochondral tissue regeneration. *European Cells and Materials*. 2010; Vol. 20 (367-378).

Lumsden A, Sprawson N, Graham A. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development*. 1991; 113:1281-1291.

Lyons. K.M., Pelton. R.W. and Hogan, BLM. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for Bone morphogenetic protein-2a (BMP-2a). *Development*. 1990; 109:833-844.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 1995;29:389–401.

- Masuda T, Salvi GE, Offenbacher S, et al. Cell and matrix reactions at titanium implants in surgically prepared rat tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12:472.
- McGonnell IM, Clarke JD, Tickle C. Fate map of the developing chick face: analysis of expansion of facial primordia and establishment of the primary palate. *Dev Dyn*. 1998; 212:102-118.
- McKee MD, Nanci A. Secretion of osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues: a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis. *Anat Rec* 1996;245: 394.
- Mina M, Upholt WB, Kollar EJ. Enhancement of avian mandibular chondrogenesis in vitro in the absence of epithelium. *Arch Oral Biol*. 1994; 39:551-562.
- Mina M, Gluhak J, Upholt WB, Kollar EJ, Rogers B. Experimental analysis of Msx-1 and Msx-2 gene expression during chick mandibular morphogenesis. *Dev Dyn*. 1995; 202:195-214.
- Mina M. Regulation of mandibular growth and morphogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001. 12(4):276-300
- Mina M, Wang YH, Ivanisevic AM, William B. Upholt and Rodgers. Region- and Stage-Specific Effects of FGFs and BMPs in Chick Mandibular Morphogenesis. 2002. *Development Dynamics* 223:333–352.
- Morrison AD. 1 + 1 = r4 and much much more. *Bioessays*. 1998; 20:794-797.
- Murray, P.D.F. Adventitious (secondary) cartilage in the chick embryo and the development of certain bones and articulations in the chick skull. *Aust, J. Zool*. 1963; 11: 368-430.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17–29.
- Nakijama M, Atsumi K y Kifume K. Development of Absorbable Sutures from Chitin. *Chitin, Chitosan and Related Enzymes*. Hacourt Brace Janovich, Nueva York. 1984; p. 407.
- Narbaitz, R., and S. S. Jande. Ultrastructural observations on the chorionic epithelium, parathyroid glands and bones from chick embryos developed in shell-less culture. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 1978; 45:1–12.

Noden DM. The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev Biol.* 1983a; 96:144-165.

Noden DM. The embryonic origins of avian cephalic and cervical muscles and associated connective tissues. *Am J Anat.* 1983b; 168:257-276.

Noden DM. Patterning of avian craniofacial muscles. *Dev Biol.* 1986; 116:347-356.

Noden DM. Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. *Development.* 1988; 103(Suppl):121-140.

Osborn JF, Newesely H. Dynamic aspects of the implant–bone interface. In: Heimke G, editor. *Dental implants: materials and systems.* München (Germany): Carl Hanser Verlag; 1980. p. 111.

Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Eto K. Mammalian craniofacial embryology in vitro. *Int J Dev Biol.* 1997; 41:187-194.

Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:530.

Park J, Gemmell CH, Davies JE. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials* 2001;19:2671.

Parr BA, McMahon AP. Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature.* 1995; 374:350-353.

Phippard, D.J., Weber-Hall, S.J., Sharpe, P.T., Naylor, M.S., Jayatalake, H., Maas, R., Woo, I., Roberts-Clark, D., Francis-West, PH, liu, Y- H.. Maxson. R., Hill. R.E. and Dale, T.C. Regulation of Msx-1, Msx- 2, BMP-2 and BMP-4 during foetal and postnatal mammary gland development. *Development.* 1996; 122: 2729-2737.

Pourquié O. The chick embryo: a leading model in somitogenesis studies. *Mech Dev.* 2004 Sep;121(9):1069-79.

Prince V, Lumsden A. Hoxa-2 expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development.* 1994; 120:911-923.

Quisenberry, J. H., and E. J. Dillon. Growing chick embryos in plastic shells. *Poultry Science.* 1962; 41:1675.

Ramsey, J. B., Jr., and M. A. Boone. Incubator for growing chick embryos in vitro and in ova. *Poultry Science.* 1972; 51:707–709.

Reisine S, Locker D. Social, psychological, and economic impacts of oral conditions and treatments. In: Cohen LK, Gift HC, editors. Disease prevention and oral health promotion: socio-dental sciences in action. Copenhagen (Denmark): Munksgaard and la Federation Dentaire Internationale; 1995. p. 33–71.

Reissmann, E., Ernsberger, U., Francis-West, P.H., Rueger, D., Brickell, P.M. and Rohrer. H. Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development*. 1996; 122: 2079-2088.

Rezania A, Healy KE. Integrin subunits responsible for adhesion of human osteoblast-like cells to biomimetic peptide surfaces. *J Orthop Res* 1999;17:615–23.

Richman JM, Tickle C. Epithelia are interchangeable between facial primordia of chick embryos and morphogenesis is controlled by the mesenchyme. *Dev Biol*. 1989; 136:201-210.

Romanoff, AL. *The Avian Embryo, Structural and Functional Development*. The Macmillan Company, 1960; New York.

Saldivar JR, Krull CE, Krumlauf R, Ariza-McNaughton L, Bronner-Fraser M Rhombomere of origin determines autonomous versus environmentally regulated expression of *Hoxa-3* in the avian embryo. *Development*. 1996; 122:895-904.

Saldivar JR, Sechrist JW, Krull CE, Ruffins S, Bronner-Fraser M. Dorsal hindbrain ablation results in rerouting of neural crest migration and changes in gene expression, but normal hyoid development. *Development*. 1997; 124:2729-2739.

Sano H, Shibasaki K, Matsukubo T y Takaesu Y. Effect of chitosan Rinsing on Reduction of dental plaque formation, *Bull. Tokio Dent Coll*. 2003; 44 (1), 9-16.

Schaub RG, Wozney J. Novel agents that promote bone regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 1991;2:868–71.

Schilling TF. Genetic analysis of craniofacial development in the vertebrate embryo. *Bioessays*. 1997; 19:459-468.

Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, et al. Differentiation of preosteoblasts is affected by implant surface microtopographies. *J Biomed Mater Res A* 2004; 69:462–8.

Semba I, Nonaka K, Takahashi I, Takahashi K, Dashner R, Shum L, et al. Positionally-dependent chondrogenesis induced by BMP4 is co-regulated by *sox9* and *msx2*. *Dev Dyn*. 2000; 217:401-414.

Serbedzija GN, Bronner-Fraser M, Fraser SE. Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development*. 1992; 116:297-307.

Shah, N.M., Groves, A.K. and Anderson, D.J. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFO superfamily members. *Cell*. 1996; 85: 331-343.

Sherer, G. K., and G. H. Dostal. Influence of medroxy-progesterone, an inhibitor of vascularization, on hepatic morphogenesis. *Journal of Cell Biology*. 1982; 95:187a

Solloway MJ, Robertson EJ. Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double-mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development*. 1999; 126:1753-1768.

Susan Standing Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice.40th Ed. Churchill Livingstone 2008.

Teillet MA, Ziller C, Le Douarin NM. Quail-chick chimeras. *Meth Mol Biol*. 1999; 97:305-318.

Trainor PA, Tan SS, Tam PP. Cranial paraxial mesoderm: regionalisation of cell fate and impact on craniofacial development in mouse embryos. *Development*. 1994; 120:2397-2408.

Trainor PA, Tam PP. Cranial paraxial mesoderm and neural crest cells of the mouse embryo: co-distribution in the craniofacial mesenchyme but distinct segregation in branchial arches. *Development*. 1995; 121:2569-2582.

Tuan, R. S. Calcium transport and related functions in the chorioallantoic membrane of cultured shell-less chick embryos. *Developmental Biology*. 1980; 74: 196–204.

Tucker AS, Al Khamis A, Sharpe PT. Interactions between Bmp-4 and Msx-1 act to restrict gene expression to odontogenic mesenchyme. *Dev Dyn*. 1998a; 212:533-539.

Vanio S, Karavanova, I., Jowett, A. and Thesleff, J. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell*. 1993; 75: 45-58.

Wagner G. Die Bedeutung der Neuralleiste für die Kopfgestaltung der Amphibienlarven. *Rev Suisse Zool*. 1949; 56:519-620.

Wang EA, Israel DI, Kelly S, et al. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors* 1993;9: 57–71.

Wang YH, Upholt WB, Sharpe PT, Kollar EJ, Mina M. Odontogenic epithelium induces similar molecular responses in chick and mouse mandibular mesenchyme. *Dev Dyn*. 1998b; 213:386-397.

Wang YH, Rutherford B, Upholt WB, Mina M. Effects of BMP-7 on mouse tooth mesenchyme and chick mandibular mesenchyme. *Dev Dyn*. 1999; 216:320-335.

Wedden SE. Epithelial-mesenchymal interactions in the development of chick facial primordia and the target of retinoid action. *Development*. 1987; 99:341-351.

Weintraub JA, Burt BA. Oral health status in the United States: tooth loss and edentulism. *J Dent Educ* 1985;49:368-78.

Whisteler RL. *Polysaccharide Chemistry*. Academic Press, Nueva York. 1983; p. 395.

Wilkinson DG. Genetic control of segmentation in the vertebrate hindbrain. *Perspect Dev Neurobiol*. 1995; 3:29-38.

Wilkinson DG, Bhatt S, Cook M, Boncinelli E, Krumlauf R. Segmental expression of Hox-2 homeobox-containing genes in the developing mouse hindbrain. *Nature*. 1989; 341:405-409.

Worthington P. History, development, and current status of osseointegration as revealed by experience in craniomaxillofacial surgery. Bränemark P I, Rydevik B L, Skalak R, editors. *Osseointegration in skeletal reconstruction and joint replacement*. Carol Stream (IL): Quintessence Publishing Co; 1997. p. 25-44.

Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1989;1: 267-80.

Wozney JM, Rosen V, Byrne M, et al. Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci Suppl* 1990;13:149-56.

Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992;32:160-7.

Wozney JM. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* 1998;106(Suppl 1):160-6.

Xia L, Zeng D, Sun X, Xu Y, Xu L, Ye D, Zhang X, Jiang X, Zhang Z. Engineering of bone using rhBMP-2-loaded mesoporous silica bioglass and bone marrow stromal cells for oromaxillofacial bone regeneration. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013; 173, 155-165

Yalpani M, Johnson F y Robinson LE. *Chitin, Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*. 1992; Elsevier, Amsterdam.

Zareen N, Khan MY, Minhas LA. 'Histological stages of retinal morphogenesis in chicken' - a descriptive laboratory research. *Italian Journal of Zoology*. 2011; 78: 45-52.

Zhao J, Zhang Z, Wang S, Sun X, Zhang X, Chen J, Kaplan DL, Jiang X. *Bone*. 2009; 45, 517-527.

Zhou H, Hammonds R Jr, Findlay DM, et al. Differential effects of transforming

growth factor-beta 1 and bone morphogenetic protein 4 on gene expression and differentiated function of preosteoblasts. *J Cell Physiol* 1993;155:112–9.