

# Autoinjerto óseo esterilizado en autoclave y reconstituido con médula ósea roja

Martín Granados-García,\* Jesús Cabrera-Rojas,\*\* Gerardo Guzmán-Flores,\*\* Enrique Estrada-Lobato,\*\*\* Ana María Cano-Valdés, & Erik Santamaría-Linares‡

## Resumen

**Introducción:** La reconstrucción ósea es un problema común en oncología. La reconstrucción mandibular se hace con colgajos microvascularizados, pero existen notorias diferencias en la forma y las dimensiones respecto a la mandíbula normal, consecuentemente son deseables nuevos métodos reconstructivos. Exploramos la factibilidad de usar un segmento mandibular esterilizado y reconstituido con médula ósea autóloga.

**Material y métodos:** Un segmento mandibular de 6 a 7 cm fue escindido en tres perros criollos. El segmento fue esterilizado en autoclave durante 40 minutos y perforado con agujeros de 3 mm cada 10 mm y reconstituido con médula ósea autóloga mezclada con hueso particulado, luego el autoinjerto fue instalado debajo del dorsal ancho.

**Resultados:** En la semana 4 posterior a la cirugía los perros recibieron renio coloidal y fueron puestos en una gammacámara. La imagen evidenció la captación del radiotrazador, que demostró la viabilidad de la médula ósea. Una hora después, el autoinjerto fue escindido y con el estudio histopatológico se corroboró la viabilidad de la médula y la formación de vasos nuevos y osteoide. En la semana 12, el tercer perro recibió MDP-<sup>99</sup>Tc y fue puesto en la gammacámara. Los resultados probaron la producción de hueso nuevo.

**Conclusiones:** La reconstrucción ósea con colgajos microvascularizados significa un problema, pero el hueso esterilizado y reconstituido con médula ósea recobra su viabilidad. Esta observación podría permitir la reconstrucción ósea, incluida la mandibular, en forma sencilla y segura en pacientes aquejados con tumores óseos. El hueso esterilizado con autoclave y reconstituido con médula ósea roja recobra su viabilidad.

**Palabras clave:** Reconstrucción ósea, reconstrucción mandibular, células troncales, ingeniería de tejidos, injerto óseo.

## Abstract

**Background:** Bone reconstruction is a common problem in the oncological setting. Mandibular reconstruction is done with microvascularized free flaps, but noticeable differences in shape and size exist in relation to the normal mandible; consequently, new reconstructive methods are desirable. We explored the feasibility of recovering osseous viability using a sterilized mandibular segment reconstituted with autologous bone marrow.

**Methods:** A 6- to 7-cm mandibular segment was excised in three Creole dogs. The segment was autoclaved for 40 min. The bone was then drilled, producing 3-mm holes every 10-mm. Bone was reconstituted with autologous bone marrow from the iliac spine mixed with particulated bone. Bone autograph was installed underneath the latissimus dorsi muscle.

**Results:** On week four after surgery, dogs received colloidal rhodium and were placed in a gamma camera. The study showed uptake of the radiotracer in the bone graft, demonstrating viability of bone marrow. One hour later, the autograph was excised in two dogs and a histopathological study corroborated the viability of the bone marrow and the formation of new vessels and osteoid. On week twelve, the third dog was administered MDP-<sup>99</sup>Tc and placed in a gamma camera. Results proved production of new bone.

**Conclusions:** Osseous reconstruction with microvascularized flaps may cause problems, but sterilized bone reconstituted with bone marrow becomes viable. This observation eventually would allow osseous reconstruction, including mandibular, easily and reliably in patients with osseous tumors. Autoclaved bone reconstituted with bone marrow recovers its viability.

**Key words:** Bone reconstruction, mandibular reconstruction, stem cells, tissue engineering, bone graft.

\* Departamento de Tumores de Cabeza y Cuello, Instituto Nacional de Cancerología (Incan).

\*\* Servicio de Anestesiología, Incan.

\*\*\* Servicio de Medicina Nuclear, Incan.

& Servicio de Patología, Incan.

‡ Servicio de Cirugía Plástica, Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

Secretaría de Salud, México, D. F.

### Correspondencia:

Martín Granados-García.

Departamento de Tumores de Cabeza y Cuello, Instituto Nacional de Cancerología,

San Fernando 22,

Col. Sección XVI,

Del. Tlalpan,

14080 México, D. F.

E-mail: martingranadosmx@yahoo.com.mx

Recibido para publicación: 11-06-2010

Aceptado para publicación: 11-08-2010

## Introducción

Dado que todos los huesos del cuerpo humano son susceptibles de afección neoplásica, la reconstrucción ósea es un problema común en oncología. El cáncer bucal y el bucofaringeo (que suelen ser diagnosticados en etapas avanzadas), así como los tumores óseos y los odontogénicos primarios pueden involucrar la mandíbula.<sup>1</sup> El tratamiento de estos tumores consiste en la resección quirúrgica y tratamiento adyuvante.<sup>2,3</sup> En los tumores mandibulares, la resección comúnmente significa una escisión segmentaria asociada con significativas secuelas funcionales y estéticas.<sup>4</sup>

La reconstrucción mandibular se hace con colgajos microvascularizados de peroné o cresta iliaca, pero los resultados son imperfectos debido a notorias diferencias en la forma y las dimensiones en relación con la mandíbula normal. Además, se debe considerar la morbilidad en el sitio donador, que implica cierta deformidad y deterioro funcional transitorio,<sup>5,6</sup> también con frecuencia la reconstrucción de los defectos extensos se complica debido a la limitada disponibilidad de tejido donador y la reabsorción ósea extensa.<sup>7,8</sup>

Aunque la reconstrucción microvascular es el estándar en la reconstrucción mandibular, ello no implica que sea perfecta ni no susceptible de eventual mejora, por ello se investigan otros enfoques, incluyendo la ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos combina los principios de las ciencias biológicas e ingeniería para generar tejidos y crear sustitutos biológicos útiles para recobrar, mantener o mejorar la función de algún tejido u órgano.<sup>9</sup> La ingeniería de tejidos para la reconstrucción mandibular podría minimizar las desventajas asociadas con el uso de colgajos libres.

Los osteoblastos son células productoras de hueso derivadas de las células troncales mesenquimales y ambas residen en la médula ósea. Cuando los osteoblastos están rodeados de matriz ósea, formando lagunas, reciben el nombre de osteocitos. En contraste, los osteoclastos son células gigantes multinucleadas responsables de la reabsorción ósea y surgen de precursores del sistema monocito-macrófago; contienen fosfata ácida, responden a hormonas tróficas y están influidos por la calcitonina. El osteoide es producido por los osteoblastos y es el precursor orgánico no mineralizado del hueso, ya que éste se forma con la mineralización de esta matriz orgánica. Para cumplir las demandas de estabilidad y rigidez, la matriz ósea mineralizada está constituida principalmente de hidroxapatita, un componente mineral formado por sales insolubles de calcio y fosfato  $[(Ca)_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , que también contiene magnesio, sodio y bicarbonato.<sup>10</sup>

La matriz ósea no es estática, constantemente es remodelada por sus componentes celulares en respuesta a estímulos mecánicos, metabólicos, regenerativos y a demandas hema-

topoyéticas. La carga mecánica es un estímulo mayor para la remodelación, que es llevada a cabo por los osteoclastos con capacidad reabsortiva del hueso, seguida de la actividad de las células formadoras de hueso, los osteoblastos.<sup>11</sup>

Los osteoblastos se originan de células progenitoras mesenquimales pluripotentes, una subpoblación de las células troncales mesenquimales capaces de diferenciarse en varios tipos celulares, incluyendo osteoblastos, condrocitos, mio-blastos y adipocitos.<sup>12</sup>

Las células troncales, que en condiciones normales permanecen quiescentes, pueden autorrenovarse por una división asimétrica que produce una hija idéntica y una segunda célula progenitora que puede comprometerse a un programa específico de diferenciación. Se acepta que estas células permanecen en un estado indiferenciado mediante la supresión de factores intrínsecos y extrínsecos, hasta que son estimuladas por lo general por alguna clase de lesión.<sup>13</sup>

Las células estromales de la médula ósea adulta son la fuente de células troncales que pueden ser inducidas a diferenciarse y ser idénticas a las células troncales mesenquimales.<sup>14</sup> La fácil proliferación de las células troncales mesenquimales las hace valiosas candidatas para aplicaciones terapéuticas<sup>15</sup> y su uso en la regeneración ósea podría ser paradigma de los conceptos de la ingeniería de tejidos.

Llevamos a cabo un estudio para explorar la factibilidad de recobrar la viabilidad ósea con un segmento óseo mandibular esterilizado en autoclave y reconstituido con médula ósea autóloga.

## Material y métodos

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

### Procedimiento quirúrgico

Seis perros criollos con edades entre uno y cuatro años y peso de 15 a 20 kg fueron mantenidos en cuarentena hasta el día del procedimiento quirúrgico. Se planeó el estudio en dos series de tres perros cada una. Ante resultados consistentes se concluiría el estudio con los primeros tres perros, para proteger a los restantes. Operamos la primera serie de tres perros el mismo día.

Después de la instalación de una línea intravenosa y de una infusión continua de solución Hartman fue iniciada la profilaxis antibiótica con cefalexina en dosis de 25 mg/kg en infusión continua durante 30 minutos, 40 minutos antes de la inducción anestésica. La inducción anestésica fue

hecha con propofol, en dosis de 4 mg/kg de peso corporal administrada en bolo; el mantenimiento se llevó a cabo con pequeños bolos a dosis-respuesta.

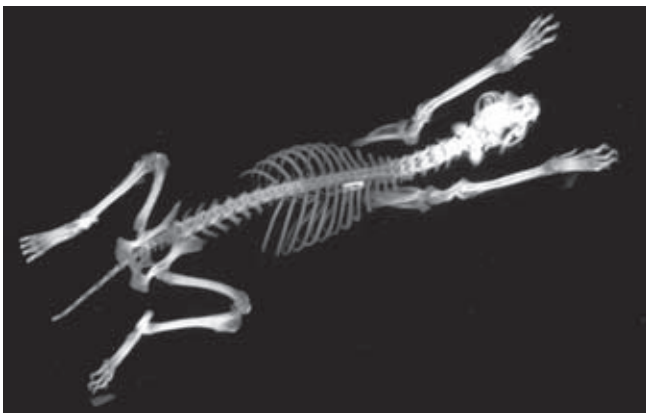
Con técnica aséptica y antiséptica se expuso la cavidad bucal para acceso intraoral. Fue escindido un segmento de 6 a 7 cm de mandíbula, después de incidir la mucosa gingival inmediatamente debajo del proceso alveolar. La exposición y resección se extendió del foramen mentoniano al ángulo de la mandíbula.

Después de eliminar mediante disección cortante todos los tejidos blandos del hueso, el fragmento fue esterilizado, depositado en un recipiente Pyrex e introducido en una autoclave a 15 kPa o 103 lbf/in<sup>2</sup> y 121 °C durante 40 minutos, mientras el perro permanecía anestesiado.

Después de la esterilización todas las piezas dentarias fueron extraídas y se hicieron perforaciones al hueso cortical hasta alcanzar el canal medular con una pieza de mano y fresas quirúrgicas de 3 mm de diámetro, cada 10 a 12 mm pero evitando el borde inferior de la mandíbula para preservar su fortaleza. Además, el borde oclusal de la mandíbula fue fresado para obtener una superficie regular.

Las partículas óseas obtenidas mediante el fresado fueron introducidas en los orificios después de mezclarlas con médula ósea obtenida de la espina iliaca anterosuperior mediante punción con una aguja para tal efecto. La mezcla fue preparada con volúmenes iguales sin el uso de anticoagulantes. La cantidad de la mezcla fue suficiente para empaquetar los orificios del hueso cortical y el canal medular.

El fragmento reconstituido fue introducido debajo del músculo dorsal ancho a través de una incisión cutánea de 2 cm; se cuidó que la hemostasia fuera perfecta (figura 1). La herida quirúrgica fue cerrada por planos con poliglactina 3-0 y la mucosa bucal con puntos separados de poliglactina 3-0.



**Figura 1.** Reconstrucción tomográfica tridimensional en un animal de experimentación en la que se observa el injerto debajo del músculo dorsal ancho.

### Cuidados posoperatorios

La profilaxis antibiótica continuó con cefalexina a una dosis de 25 mg/kg de peso corporal por el hocico, administrada cada 24 horas hasta completar 72 horas, con inicio 12 horas después de la conclusión de la cirugía. La analgesia fue hecha con rofecoxib a una dosis de 2 mg/kg de peso corporal por el hocico, dos veces al día por tres días. La alimentación se reinició 12 horas después de la cirugía con dieta blanda.

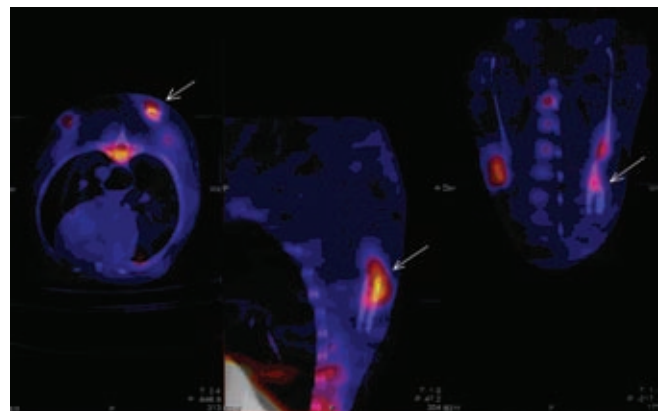
### Evaluación de la viabilidad

La evaluación de viabilidad se realizó con un gammagrama de médula ósea después de administrar 15 mCi de renio coloidal, cuatro semanas después de la cirugía. Una hora después de la conclusión del gammagrama los perros 1 y 2 fueron sometidos a escisión quirúrgica del segmento mandibular para su evaluación histológica.

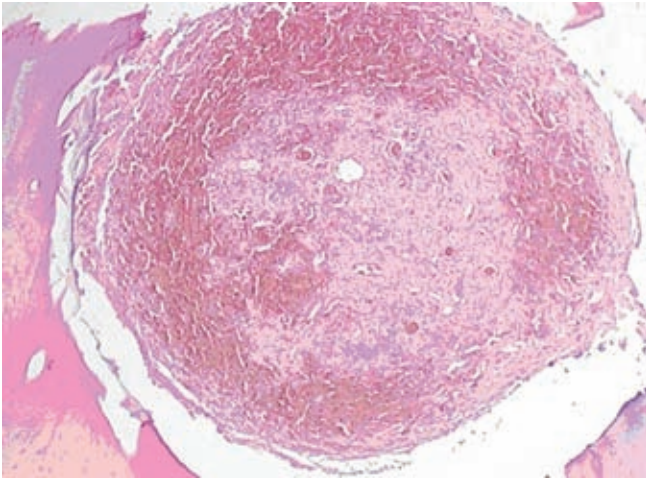
Al perro 3 se le realizó un gammagrama óseo en la semana 12 administrando 20 mCi de MDP-<sup>99</sup>Tc para corroborar la formación de hueso. Una hora después el fragmento óseo fue escindido para su estudio histológico. Al término de las evaluaciones los perros fueron sacrificados con una sobredosis de propofol.

## Resultados

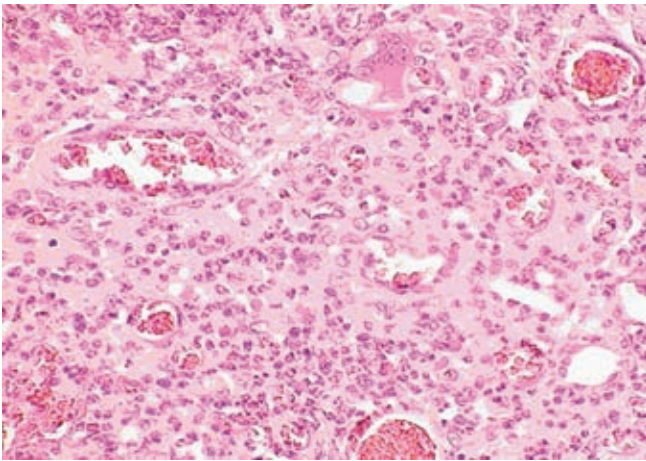
La cirugía se realizó únicamente en los tres perros iniciales debido a resultados consistentes. El tiempo quirúrgico promedio fue de 90 minutos (rango 70 a 110). La hemorragia promedio fue de 100 ml (rango de 60 a 140). El posoperatorio transcurrió sin eventualidades. Las heridas de la cavidad bucal y del dorso sanaron sin problemas.



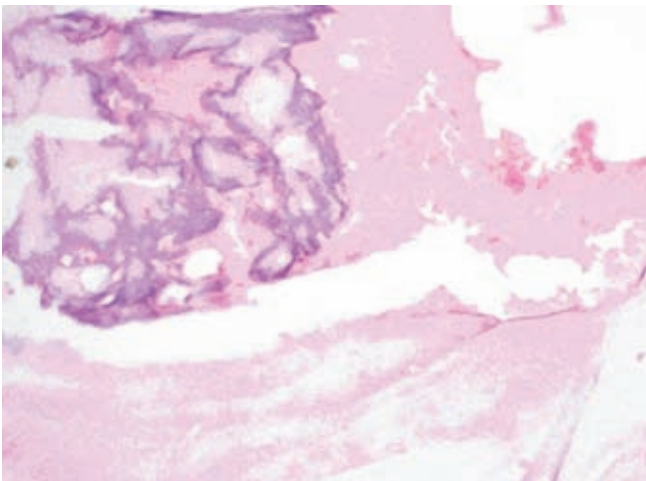
**Figura 2.** Gammagrama con 15 mCi de renio coloidal fusionado con una imagen tomográfica en la que se aprecia la captación del radio-trazador, lo cual indica la viabilidad de la médula ósea.



**Figura 3.** Imagen típica de los orificios. Obsérvese la médula ósea viable y la formación de vasos nuevos.



**Figura 4.** Imagen histológica típica con mayor amplificación.



**Figura 5.** Trabécula ósea (parte inferior). Dentro del espacio hay osteoide inmaduro (más basófilo).

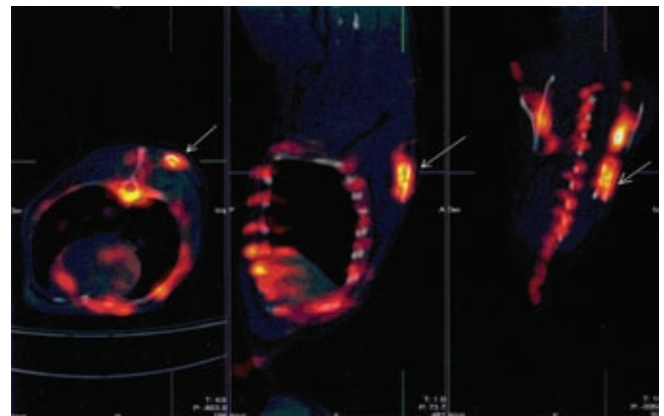
En la semana 4 se practicó en los tres perros un gammagrama de médula ósea roja con renio coloidal que demostró la captación selectiva por la médula ósea del hueso instalado en el lomo, consistente con la viabilidad de la médula ósea en el hueso reconstituido de los tres animales (figura 2).

La imagen del gammagrama fue fusionada con una imagen tomográfica para la mejor evaluación anatómica de las zonas captantes. Los fragmentos de mandíbula de los perros 1 y 2 fueron procesados para estudio histopatológico. En ambos se demostró médula ósea viable asociada con nuevos vasos sanguíneos, más osteoide y algunos osteoclastos (figuras 3, 4 y 5). Estos cambios predominaron en las perforaciones practicadas al autoinjerto; en la pieza del perro 1 algunos orificios mostraron celularidad consistente con infiltración inflamatoria aguda y formación de microabscesos, compatible con osteomielitis.

En la semana 12, en el perro 3 un gammagrama óseo mostró la integración de minerales al osteoide y, por lo tanto, la formación de hueso nuevo (figura 6). Esto fue apoyado por la observación previa en el estudio histopatológico del segmento óseo de formación de matriz proteica no mineralizada u osteoide. A final de la evaluación los perros fueron sacrificados con una sobredosis de propofol.

## Discusión

Bajo condiciones normales, la proliferación, diferenciación y migración de los osteoblastos está influida por hormonas y factores de crecimiento. Estos factores actúan sobre pro-osteoblastos por medio de receptores específicos para activar vías de señalización intracelular e inducir su diferenciación a osteoblastos maduros.



**Figure 6.** Imagen típica del gammagrama óseo con 20 mCi de MDP-<sup>99</sup>Tc que muestra la captación del radiotrazador en el autoinjerto, prueba de la formación de hueso nuevo.

Los factores de transcripción específicos son esenciales para el desarrollo de los osteoblastos (*runx2/core binding factor al* y *osteorix*) y su diferenciación. Su activación causa la producción de matriz extracelular y osteoide-colágeno tipo I y la expresión secuencial de fosfatasa alcalina y otras moléculas asociadas con el hueso, como colágeno tipo I, osteopontina, osteocalcina y sialoproteína ósea.<sup>16</sup>

Los osteoblastos, en la superficie del hueso, son diferentes a los osteocitos dentro de las lagunas del hueso cortical ya que estos últimos están conectados por largos procesos citoplasmáticos a través de una red dispersa de canaliculos y lagunas, que les permite sentir los cambios mecánicos y en los fluidos. Además, la sintetasa de óxido nítrico toma parte de la regulación y homeostasis del calcio en la remodelación ósea.

Los osteoclastos también derivan de células troncales hematopoyéticas y tienen receptores de calcitonina y son capaces de reabsorber el hueso mineralizado mediante la producción de ácido y enzimas específicas. Los osteoblastos también producen un activador del receptor del factor de unión del factor-kappa B, que actúa en receptores específicos de los pro osteoclastos para inducir su diferenciación en osteoclastos.<sup>17</sup>

La evidencia muestra que las células troncales, bajo condiciones apropiadas, pueden diferenciarse en células de tejidos maduros, lo cual hace posible regenerar tejidos para su reemplazo por enfermedad o lesiones. Las células troncales mesenquimales están presentes en la médula ósea y tienen la habilidad de diferenciarse, entre otros tejidos, en osteoblastos y formar tejido óseo.<sup>18</sup>

Además de los elementos osteoblásticos descritos, en la ingeniería de tejidos otro componente importante son los moldes, que deben tener propiedades osteoinductivas y osteoconductoras. Un material osteoinductivo provee el estímulo biológico para que las células troncales mesenquimales se diferencien en osteoblastos diferenciados, mientras que un material osteoconductor provee el "andamio" o la estructura tridimensional para su infiltración con el hueso nuevo, mientras que la osteogénesis o capacidad para formar hueso nuevo se debe a que en el molde existen células capaces de diferenciarse en osteoblastos del hueso.<sup>19</sup>

Se han usado materiales sintéticos y naturales como moldes osteoinductores y osteoconductores y se ha concluido que el mejor osteoinductor y osteoconductor es el hueso. Se ha descrito el uso de hueso, con o sin médula, y de pequeños fragmentos de hueso heterólogo procesado comercialmente, principalmente bovino, con o sin la adición de médula ósea, con resultados variables.<sup>20,21</sup>

Conforme estos conceptos se llevó a cabo reconstrucción mandibular en humanos con una malla de titanio que se llenó con hueso esponjoso del propio paciente, colágena, hueso particulado comercial y proteína morfogenética ósea con

el propósito de propiciar la generación de hueso nuevo.<sup>22,23</sup> Aunque el procedimiento se aplicó a un defecto oncológico, pensamos que podría simplificarse con la misma mandíbula resecada como molde, una vez que ha sido esterilizada para eliminar todos los tejidos viables y los neoplásicos, para dejar solo la matriz ósea mineralizada. Esta modalidad, sin la reconstitución con médula ósea, ha demostrado ser un procedimiento oncológico seguro para la reconstrucción de la pelvis y huesos de las extremidades, después de que las preocupaciones iniciales en relación con la viabilidad de los tejidos neoplásicos desapareció.<sup>24</sup>

Si bien el experimento solo demuestra la viabilidad ósea y su utilidad en la reconstrucción mandibular, experiencias publicadas con modelos semejantes pero sin los tres elementos aquí descritos han comprobado la consolidación y con ello su utilidad reconstructiva. Nuestro modelo sería aplicable si el hueso no está extensamente destruido por el tumor y si preserva la forma y dimensiones exactas del hueso, lo que evitaría obtener moldes sintéticos mediante imágenes, que añaden complejidad y costos.

Este procedimiento se basa en las propiedades osteoinductivas y osteoconductoras del hueso y eliminaría la necesidad de movilizar extensos tejidos distantes, como sucede con los colgajos microvasculares.

Se han explorado diversos enfoques para generar tejido óseo con éxito variable. Así, formas similares de reconstrucción han sido usadas con resultados inconstantes para reemplazar los huesos largos, pero estas técnicas usan células troncales expandidas y asociadas con moldes sintéticos como hidroxapatita<sup>25</sup> o hueso esterilizado heterólogo y homólogo, ya sea pasteurizado, radiado o congelado, pero sin adicionar médula ósea autóloga.<sup>26</sup> Hasta ahora no conocemos informes previos de la combinación de los tres factores: osteoinductivos, osteoconductoras y osteoblásticos, con la mandíbula original, como proponemos.

Se podría invocar que la viabilidad del injerto se debe a la migración de las células de la médula ósea hacia el segmento reimplantado desde el hueso remanente, lo que complica la evaluación, pero con la localización temporal debajo del músculo dorsal ancho se demuestra que la viabilidad es atribuible a la médula ósea aplicada al injerto.

Una ventaja de este modelo es la posibilidad de una reconstrucción diferida, contemporizando mediante la inserción del injerto debajo del músculo dorsal ancho que daría la oportunidad para concluir el tratamiento oncológico sin poner en peligro su viabilidad y sin causar el crecimiento tumoral por medio del teórico efecto paracrino de las células del injerto en las células tumorales residuales.

Si bien tres casos es un número reducido para demostrar la factibilidad del procedimiento, es necesario considerar que un hueso esterilizado no es un tejido viable y en con-

secuencia es evidente que la viabilidad se debe a la adición de la médula ósea.

En modelos similares se ha propuesto que se requieren factores tróficos externos para estimular la formación de hueso, como BMP (*bone morphogenetic protein*) usado por algunos autores<sup>27</sup> o plasma rico en plaquetas con el uso de hueso esponjoso,<sup>28</sup> sin embargo, dado que nuestro modelo prescinde de éstos concluimos que los inductores deben estar en el hueso. Creemos que el hueso esterilizado con daño térmico provee el estímulo para que las células mesenquimales se diferencien en osteoblastos, sin la necesidad de factores tróficos externos. Pensamos que la esterilización desempeña un papel importante al eliminar los tejidos neoplásicos, pero también al proveer una señal obligatoria para la diferenciación celular, quizá a través de la exposición de ciertas proteínas en la matriz mineralizada.

Se sabe que las células progenitoras pluripotenciales presentes en la médula ósea<sup>29</sup> bajo el estímulo apropiado, incluyendo el daño hístico, pueden diferenciarse a osteoblastos con la habilidad para producir osteoide, que pronto se calcifica e induce la formación de vasos nuevos. En consecuencia, en nuestro modelo la matriz ósea mineralizada debe ser reabsorbida y reemplazada con nuevo osteoide y matriz ósea mineralizada producida por los osteoblastos. La formación de hueso nuevo fue demostrada por la formación de matriz proteica u osteoide en el estudio histopatológico y mediante la detección de reacción osteoblástica en el estudio gammagráfico con MDP-<sup>99</sup>Tc, lo que significa la aposición de minerales en esta matriz. Ésta es la forma habitual de demostrar la viabilidad en los pacientes reconstruidos con colgajos óseos.<sup>30</sup>

Además, creemos que las perforaciones practicadas al hueso son importantes para mantener la viabilidad de la médula ósea, debido a que facilitan el paso de vasos de neoformación al canal medular del injerto. Los resultados inconstantes previamente informados con injertos sin esterilizar mayores de 4 cm podrían deberse a la dificultad para proveer suficiente irrigación al hueso medular en los momentos decisivos. Con las perforaciones podría disponerse de longitudes ilimitadas de hueso ya que su viabilidad no dependería de la formación de vasos desde el canal medular del hueso remanente, sino surgirían, a mucha menor distancia, de los tejidos blandos circundantes.

## Conclusiones

Se requieren más estudios para demostrar la viabilidad a largo plazo y la capacidad de integración del autoinjerto, pero creemos que este procedimiento podría ser aplicado a la reconstrucción ósea sin la necesidad de factores tróficos externos.

## Referencias

1. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Compendio de cáncer 2002. Registro histopatológico de las neoplasias malignas en México; 2002. Información Nacional. México: Secretaría de Salud; 2003. pp. 3,5.
2. Cooper JS, Pajak TF, Forastieri A, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2004;350:1937-1944.
3. Bernier J, Domenege C, Ozhamin M, Matuszeka K, Lefebvre J, Greiner R. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 2004;350:1945-1952.
4. Cordeiro PG, Santamaría E, Disa J. Mandible reconstruction. En: Shah JP, ed. *Head and Neck Cancer*. Hamilton, Ontario: Decker; 2001. pp. 358-375.
5. Warnke PH, Springer ING, Aci WI, Eufinger AH, Wehmaller M, Russo PA, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004;364:766-770.
6. Miller MJ. Osseous tissue engineering in oncologic surgery. *Semin Surg Oncol* 2000;18:294-301.
7. Urken M. Recipient vessel selection in free tissue transfer to the head and neck. En: Urken ML, Cheney ML, Sullivan M, Biller HF, eds. *Atlas of Regional and Free Flaps for Head and Neck Reconstruction*. New York: Raven Press; 1995. pp. 331-340.
8. Urken M. Iliac crest osteocutaneous and osteomusculocutaneous. En: Urken ML, Cheney ML, Sullivan M, Biller HF, eds. *Atlas of Regional and Free Flaps for Head and Neck Reconstruction*. New York: Raven Press; 1995. pp. 261-290.
9. Vacanti JP, Langer JP. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 1999;354(suppl):32-34.
10. Wang X, Puram S. Toughness of cortical bone and its relationship with age. *Ann Biomed Eng* 2004;32:123-135.
11. Jilka RL. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol* 2003;41:182-185.
12. Parfitt AM. Osteonal and hemiosteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult bone. *J Cell Biochem* 1994;209:29-39.
13. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-192.
14. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;251:3-11.
15. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001;7:259-264.
16. Wang X, Puram S. Toughness of cortical bone and its relationship with age. *Ann Biomed Eng* 2004;32:123-135.
17. Rouselle AV, Heyman D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* 2002;30:533-540.
18. Parfitt AM. Osteonal and hemiosteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult bone. *J Cell Biochem* 1994;209:29-39.
19. Miller MJ. Osseous tissue engineering in oncologic surgery. *Semin Surg Oncol* 2000;18:294-301.
20. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:56-59.

21. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Aleksic Z, Kenney EB. Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcations in humans. *J Clin Periodontol* 2003;30:746-751.
22. Gronthos S. Reconstruction of human mandible by tissue engineering. *Lancet* 2004;364(9436):735-736.
23. Warnke PH, Springer ING, Aci WI, Eufinger AH, Wehmaller M, Russo PA, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004;364:766-770.
24. Dae-Geun J, Min Suk K, Wan Hyeong C, Won Seok S, Soo-Yong L. Reconstruction with pasteurized autograft-total hip prosthesis composite for periacetabular tumors. *J Surg Oncol* 2007;96:493-502.
25. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bones with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344:385-386.
26. Ewers R, Wangerin K. The autoclaved autogenous reimplant, an immediately replaced, mineral frame. *Maxillofac Surg* 1986;14:138-142.
27. Herford AS, Boyne PJ, Rawson R, Williams RP. Bone morphogenetic protein-induced repair of the premaxillary cleft. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:2136-2141.
28. Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31:615-619.
29. Parfitt AM. Osteonal and hemiosteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult bone. *J Cell Biochem* 1994;209:29-39.
30. Bergstedt HF, Karloff B, Lind MG, Wersall J. Scintigraphy of human autologous rib transplants to a partially resected mandible. *Scand J Plast Reconstruct Surg* 1978;12:151-156.