



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Uso de la Terapia Celular (Células Madre Mesenquimales de la Médula Ósea y Células Madre Mesenquimales de la Bola Adiposa de Bichat) en Materiales Biocerámicos para la Regeneración Ósea de la Sínfisis Mandibular de Ratas Sanas, Diabéticas, Osteoporóticas y Diabéticas con Osteoporosis

D^a Ana María Mercado Díaz

2021



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Fabio Camacho Alonso, Profesor Titular de Universidad del Area de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Uso de la terapia (células madre mesenquimales de la médula osea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales bioceramicos para la regeneración física de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis”, realizada por D^{id}. Ana Maria Mercado Diaz, bajo mi in mediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 6 de Mayo de
2021

Mod: T-20

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es la cúspide de un estudio iniciado años atrás y que refleja el resultado de una compleja y laboriosa pero, a la vez, maravillosa investigación desarrollada no sólo por la persona que redacta y organiza las siguientes páginas, sino también por un gran equipo de personas que permitieron que este trabajo se realice con precisión y rigurosidad, además de suponer la labor más apasionante que he podido desarrollar en mi primera etapa como profesional de la Odontología. Por ello, me gustaría agradecer a cada una de las personas que, a través de su esfuerzo, hicieron posible este gran estudio.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director Fabio Camacho Alonso, quien con sus conocimientos, su tiempo y su apoyo constante me guió en cada una de las etapas de este estudio, brindándome la oportunidad de desarrollar esta extraordinaria investigación, abriendo un camino desconocido para mí y que ha llegado a convertirse en una verdadera pasión, a la que no abandonaré a lo largo de mi trayectoria profesional.

Igualmente y con el mismo aprecio, quiero reconocer la sabiduría que me ha aportado y la paciencia que me ha regalado Rosario Tudela Mulero, mi mentora en los conocimientos y prácticas que adquirí sobre cultivo celular durante estos largos años de trabajo. Sus horas en el laboratorio, donde tantos momentos hemos pasado en busca del mejor protocolo para poder obtener los resultados que buscábamos, hizo que admirase no sólo su gran labor profesional sino su gran calidad humana, siempre tan desinteresada y tan dispuesta a colaborar y que, gracias a su ejemplo, hizo que me apasionase por el magífico campo de la Biología. Gracias por tus valores y esfuerzo, que hicieron posible el desarrollo de esta investigación.

A todo el personal del servicio de cultivos celulares del S.A.C.E y del L.A.I.B, con quienes tantas horas he pasado y quienes me brindaron sus grandes conocimientos, paciencia y amabilidad; entre los que destaco a Toñi, Pepe, Silvia, Maria Jesús y, por supuesto, a mi querida Juana, a quien tantas veces tuve que recurrir y me brindó siempre su ayuda más desinteresada, facilitándome el trabajo y buscando siempre las mejores condiciones para obtener los mejores resultados. De todos ellos me llevo el recuerdo y el ejemplo de ser los mejores profesionales con los que he tenido la suerte de encontrarme. De la misma manera, quiero reconocer al equipo del servicio de experimentación animal, tanto del Animalario del Campus de Espinardo, como del Campus de Ciencias de la Salud

(C.E.I.B), donde tuve la gran suerte de descubrir a excelentes personas y profesionales a los que siempre llevaré en mi recuerdo y que gracias a su ayuda este trabajo ha sido posible; destacando a Nuria García y Javier Pardo, siempre tan dispuesto a hacer su trabajo de forma impecable y con gran esmero; a Enrique, Antonio, Mari Paz, Maria Fermina, por su atención y ayuda y, en especial, a Fran Zapata que con sus buenos días tan alegres, su gran sonrisa y su ayuda sin interés me facilitó todo lo necesario para poder acabar las largas jornadas de cirugía en aquellos quirófanos. Igualmente, a Jose María Fernández, del servicio de análisis de imagen, a quien tantas veces tuve que acudir. Al servicio de microscopía, haciendo gran hincapié en Paco Asensio, Teresa Coronado y Laura Guzmán, siempre tan dispuestos a ayudar de la mejor manera, ofreciéndome sus protocolos y enseñándome sus técnicas.

A todos ellos, les debo no sólo el resultado de un trabajo realizado con esmero, precisión y cuidado, sino también el gran ejemplo que han dejado en mí para el resto de años de mi carrera profesional.

No podría haber realizado este trabajo con el mismo rigor, sin el aporte de conocimientos y valores del Dr. Arturo Sanchez Pérez, quien me acompañó durante estos años y que, gracias a su capacidad, eficacia y buena labor, pude llevar a cabo este trabajo como se requiere. Asimismo, a aquellos grandes maestros y maestras que tuve el gran placer de acompañarlos, aunque sea durante un breve periodo de tiempo pero que, sin saberlo, dejan en sus alumnos un gran ejemplo de profesionalidad y calidad humana.

A mi madre, Mari Carmen, gracias a ella puedo escribir estas palabras, pues a través de su sacrificio, esfuerzo y trabajo incansable nos brindó a mis hermanas y a mí la posibilidad de estudiar y que, gracias a su enseñanza en valores de perseverancia, honestidad, responsabilidad y sacrificio pude tener y hacer realidad, esta maravillosa meta. Y, por supuesto, a mis hermanas Elisa y Mercedes, por el gran ejemplo que han sido para mí, no sólo a nivel profesional sino también a nivel personal, por haberme acompañado en este camino de la vida y a las que espero no haber defraudado.

Igualmente, agradecer a mis compañeras de vida: Inma, Elena, Paula, Helena, Belén y Ana, quienes con sus palabras de ánimo y los maravillosos momentos compartidos han hecho de estos años el complemento perfecto para poder seguir adelante. Y, sobre todo, por haber entendido mis momentos de ausencia por la dedicación que ha supuesto poder llevar a cabo este apasionante trabajo. Gracias por haberme cogido de la mano y nunca haberme soltado.

Finalmente, me gustaría acabar agradeciendo a todas las personas que, mediante su trabajo y lucha obstinada, hicieron posible la igualdad de oportunidades en el acceso a la enseñanza universitaria, porque gracias a su incansable esfuerzo he podido realizar mis estudios y obtener este magnífico resultado.

A todos ellos, GRACIAS.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABC: complejo avidina-biotina-peroxidasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGEs: productos finales de glicosilación avanzada

ARN: ácido ribonucleico

BAB: bola adiposa de Bichat

BCs: biocerámicas

BMP-2: proteína morfogenética ósea 2

CaP: fosfato de calcio

CEEA: Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia

CMM: células madre mesenquimales

CMM-A: células madre mesenquimales adiposas

CMM-BAB: células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat

CMM-MO: células madre mesenquimales de la médula ósea

CMM-SC: células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo subcutáneo

CO₂: dióxido de carbono

CT: tomografía computarizada

DEX: dexametasona

DM: diabetes mellitus

DMEM: medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco

DMO: densidad mineral ósea

DM1: diabetes tipo 1

DM2: diabetes tipo 2

DOTC: defectos óseos de tamaño crítico

DPP-4: dipeptidil peptidasa-4

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ERO: especies reactivas de oxígeno

FATR: fosfatasa ácido resistente al tartrato

FCEV: factor de crecimiento endotelial vascular

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

FVE: fracción vascular estromal

g: gramos

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

g/cm²: gramos por centímetro cuadrado

g/L: gramos por litro

HA: hidroxiapatita

HbA1c: hemoglobina glicosilada

H-E: hematoxilina y eosina

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

IAPP: polipéptido amiloide de los islotes

Ig: inmunoglobulina

IGF: factor de crecimiento similar a la insulina

IL: interleucina

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular

kV: kilovoltaje

MEM: medio esencial mínimo

mg/dl: miligramos por decilitro

mg/kg: miligramos por kilogramo

ml: mililitros

mm: milímetros

mM: milimolar.

mg/mL: miligramos por mililitro

mg/kg: miligramos por kilogramo

micro-CT: micro tomografía computarizada

OCN: osteocalcina

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPN: osteopontina

p: p-valor

PCL: policaprolactona

PET: tomografía por emisión de positrones

PBS: tampón fosfato alcalino

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaqueta

PGA: productos finales de glucosilación avanzada

PH: potencial de hidrógeno

PPAR γ : receptor de peroxisoma proliferador activado gamma

PTH: hormona paratiroidea

p/v: peso del soluto por volumen de disolución

NaHCO₃: bicarbonato de sodio

NH₄Cl: cloruro de amonio

NOS: enzima oxido nítrico sintetasa

RAGE: receptor para los productos de glicosilación avanzada

ROI: región de interés

rpm: revoluciones por minuto

SAI: Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia

SFB: suero fetal bovino

SPECT: tomografía computarizada por emisión de fotón único

SrCs: cerámicas porosa de silicato de calcio sustituida por estroncio

STZ: estreptozotocina

TBO: azul de toluidina

TBS: solución salina tamponada con Tris

TCP: fosfatos tricálcicos

TGF- β 1: factor de crecimiento beta 1

TZD: tiazolidinedionas

UH: unidades Hounsfield

U/mL: unidades por mililitros

β -GP: β -glicerofosfato

μ A: microamperios

μ g: microgramos

μ m: micrómetro

μ M: micromolar

°C: grados centígrados

RESUMEN

Introducción: los defectos óseos de tamaño crítico (DOTC) pueden dificultar la rehabilitación funcional y estética mediante el tratamiento con implantes dentales en pacientes sanos. La presencia de enfermedades sistémicas como la diabetes o la osteoporosis pueden complicar aún más la regeneración de los DOTC. En estos casos, pueden ser útiles los injertos de células madre mesenquimales de la médula ósea (CMM-MO) y de la bola adiposa de Bichat (CMM-BAB) cultivadas en biomateriales. **Objetivo:** el objetivo de este estudio es comparar la formación de nuevo hueso en los defectos óseos de tamaño crítico en la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas-osteoporóticas tras el tratamiento con biocerámicas (BCs) con o sin CMM-MO/CMM-BAB. **Materiales y Métodos:** un total de 96 ratas Sprague-Dawley hembras fueron aleatorizadas en cuatro grupos (n=24 por grupo): grupo 1 sanas, grupo 2 diabéticas, grupo 3 osteoporóticas y grupo 4 diabéticas con osteoporosis. Se utilizó estreptozotocina para inducir diabetes tipo 1 en los grupos 2 y 4 mientras que se realizó ovariectomía bilateral para inducir osteoporosis en los grupos 3 y 4. El área central de la sínfisis mandibular del roedor fue usada como DOTC. En cada grupo, ocho defectos fueron operados únicamente con BCs (hidroxiapatita al 60% y β -fosfato tricálcico al 40%), otras ocho lesiones fueron intervenidas con CMM-MO cultivadas en BCs y las ocho restantes se trataron con BCs y CMM-BAB. Los animales fueron sacrificados a las 4 y a las 8 semanas para evaluar la regeneración ósea a corto y largo plazo y, posteriormente, las mandíbulas fueron procesadas mediante microtomografía computarizada para analizar el grado de unión ósea radiológica y la densidad mineral ósea (DMO); análisis histológico de la unión del hueso y análisis inmunohistoquímico, que incluía inmunoreactividad del factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) y de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2). **Resultados:** en todos los grupos (sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis), los DOTC que fueron tratados con BCs + CMM-BAB mostraron mayor unión ósea radiológica, densidad mineral ósea, unión ósea histológica y mayor positividad de FCEV y BMP-2 que aquellos tratados con BCs + CMM-MO y, a su vez, este último subgrupo reveló valores superiores a los tratados únicamente con BCs tanto a las 4 como a las 8 semanas con diferencias estadísticamente significativas. **Conclusiones:** La aplicación de las CMM-BAB cultivadas en las BCs bifásicas mejora la regeneración ósea de los DOTC en comparación con el tratamiento de CMM-MO junto a BCs y que aquellos regenerados con BCs únicamente. **Relevancia clínica:** los resultados de este estudio pueden ayudar a la rehabilitación funcional y estética de pacientes sanos,

diabéticos, osteoporóticos y, sobre todo, a aquellos que manifiestan ambas enfermedades de manera concomitante para tratar defectos óseos de tamaño crítico aunque futuros estudios serán necesarios con el fin de disponer de una mayor evidencia científica.

Palabras claves: biocerámicas, células madre mesenquimales de la médula ósea, células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat, sínfisis mandibular, regeneración ósea, osteoporosis, diabetes.

SUMMARY

Background: critical-sized bone defects (CSBDs) can hamper functional and aesthetic treatment with dental implants in healthy patients. Systemic diseases such as diabetes or osteoporosis can further complicate the regeneration of CSBDs. For that reason, bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and buccal fat pad mesenchymal stem cells (BFPSCs) cultivated in biomaterials may be useful. **Objective:** to compare new bone formation in rat mandibular symphysis critical-sized defects (CSBDs) in healthy, diabetics, osteoporotics, and diabetics-osteoporotics rats filled with bioceramics (BCs) with or without bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and buccal fat pad mesenchymal stem cells (BFPSCs). **Materials and Methods:** A total of 96 adult female Sprague-Dawley rats were randomized into four groups (n=24 per group): Group 1 healthy, Group 2 diabetics, Group 3 osteoporotics, and Group 4 diabetics-osteoporotics rats. Streptozotocin was used to induce type 1 diabetes in Group 2 and 4, while bilateral ovariectomy was used to induce osteoporosis in Group 3 and 4. The central portion of the rat mandibular symphysis was used as a physiological CSBD. In each group, eight defects were filled with BCs (hydroxyapatite 60% and β -tricalcium phosphate 40%) alone, another eight with BMSCs cultured on BCs and the remaining eight were filled with BCs and BFPSCs. The animals were sacrificed at 4 and 8 weeks, and the mandibles were processed for micro-computed tomography to analyze radiological union and bone mineral density (BMD); histological analysis of the bone union; and immunohistochemical analysis, which included immunoreactivity of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). **Results:** In all groups (healthy, diabetics, osteoporotics, and diabetics-osteoporotics), the CSBDs filled with BCs + BFPSCs showed greater radiological bone union, BMD, histological bone union, and more VEGF and BMP-2 positivity than those CSBDs treated with BCs + BMSCs and, in turn, this last revealed higher values than those treated with BCs alone (at 4 and 8 weeks) with statistically significant differences. **Conclusions:** Application of BFPSCs cultured on biphasic BCs improves bone regeneration in CSBDs compared with treatment of BMSCs with BCs and that those regenerated with biphasic BCs alone in healthy, diabetics, osteoporotics, and diabetics-osteoporotics rats. **Clinical relevance:** The results of this study can help the functional and aesthetic rehabilitation of healthy, diabetic, osteoporotic and, above all, those who manifest both diseases concomitantly; although future studies will be necessary in order to have more scientific evidence.

Key words: bioceramics, bone marrow mesenchymal stem cells, buccal fat pad mesenchymal stem cells, mandibular symphysis, diabetes, osteoporosis, bone regeneration.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 10 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. REGENERACIÓN ÓSEA..... | 1 |
| 1.1.1. Definición..... | 1 |
| 1.1.2. Tratamiento | 1 |
| 1.2. REGENERACIÓN ÓSEA Y OSTEOPOROSIS | 6 |
| 1.2.1. Definición..... | 6 |
| 1.2.2. Epidemiología | 7 |
| 1.2.3. Etiología | 10 |
| 1.2.4. Patogenia | 12 |
| 1.2.5. Cuadro clínico | 14 |
| 1.2.6. Diagnóstico..... | 15 |
| 1.2.7. Tratamiento | 17 |
| 1.2.8. Inducción de la osteoporosis en modelos de experimentación animal | 20 |
| 1.3. REGENERACIÓN ÓSEA Y DIABETES | 22 |
| 1.3.1. Definición..... | 22 |
| 1.3.2. Epidemiología | 23 |
| 1.3.3. Etiología | 23 |
| 1.3.4. Patogenia | 24 |
| 1.3.5. Cuadro clínico | 31 |
| 1.3.6. Diagnóstico..... | 31 |
| 1.3.7. Tratamiento | 32 |
| 1.3.8. Inducción de la diabetes en modelos de experimentación animal | 33 |
| 1.4. REGENERACIÓN ÓSEA Y OSTEOPOROSIS + DIABETES | 35 |
| 1.5. ELEMENTOS DE LA INGENIERÍA TISULAR ÓSEA | 38 |
| 1.5.1. Matrices sintéticas tridimensionales | 38 |
| 1.5.2. Células madre mesenquimales..... | 41 |
| 1.5.3. Células madre mesenquimales de la médula ósea (CMM-MO)..... | 42 |
| 1.5.4. Aplicación de las CMM-MO frente al concentrado de médula ósea (CMO) | 44 |
| 1.5.5. Células madre mesenquimales del tejido adiposo (CMM-A)..... | 50 |
| 1.6. MATERIALES EMPLEADOS EN LA REGENERACIÓN ÓSEA..... | 57 |
| 1.6.1. Cerámicas bifásicas: hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico..... | 57 |
| 1.6.2. Cerámicas bifásicas y CMM..... | 64 |
| 1.7. MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN LAS INVESTIGACIONES <i>IN VIVO</i> DE LA INGENIERÍA TISULAR ÓSEA | 67 |
| 1.7.1. Factores implicados en la elección del modelo animal | 67 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 1.7.2. | Animales más frecuentemente utilizados en los estudios <i>in vivo</i> sobre la regeneración ósea..... | 69 |
| 2. | JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS..... | 79 |
| 2.1. | JUSTIFICACIÓN..... | 79 |
| 2.2. | OBJETIVOS..... | 83 |
| 3. | MATERIAL Y MÉTODOS..... | 86 |
| 3.1. | MATERIAL..... | 86 |
| 3.2. | MÉTODOS..... | 88 |
| 3.2.1. | Animales de experimentación..... | 88 |
| 3.2.2. | Aislamiento, cultivo y expansión celular para obtener células madre mesenquimales de la médula ósea de rata..... | 88 |
| 3.2.3. | Aislamiento, cultivo y expansión celular para obtener CMM-BAB de rata..... | 93 |
| 3.2.4. | Animales de experimentación..... | 98 |
| 3.2.5. | Grupos experimentales: randomización de la muestra..... | 99 |
| 3.2.6. | Inducción de diabetes mellitus en los animales de experimentación..... | 101 |
| 3.2.7. | Inducción de osteoporosis en los animales de experimentación..... | 102 |
| 3.2.8. | Procedimiento quirúrgico..... | 106 |
| 3.2.9. | Sacrificio de los animales de experimentación..... | 113 |
| 3.2.10. | Variables de estudio..... | 113 |
| 3.2.11. | Tratamiento estadístico..... | 117 |
| 4. | RESULTADOS..... | 120 |
| 4.1. | ANÁLISIS POR MICRO-CT (UNIÓN ÓSEA RADIOLÓGICA Y DMO)..... | 120 |
| 4.1.1. | Resultados de la regeneración ósea empleando CMM-MO..... | 120 |
| 4.1.2. | Resultados de la regeneración ósea empleando CMM-BAB..... | 123 |
| 4.1.3. | Resultados radiológicos comparativos de la regeneración ósea empleando CMM-MO y CMM-BAB..... | 126 |
| 4.2. | ANÁLISIS HISTOLÓGICO (UNIÓN ÓSEA HISTOLÓGICA)..... | 128 |
| 4.2.1. | Resultados de la regeneración ósea empleando CMM-MO..... | 128 |
| 4.2.2. | Resultados de la regeneración ósea empleando CMM-BAB..... | 130 |
| 4.2.3. | Resultados histológicos comparativos de la regeneración ósea empleando CMM-MO y CMM-BAB..... | 132 |
| 4.3. | ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO..... | 133 |
| 4.3.1. | Expresión de FCEV..... | 133 |
| 4.3.2. | Expresión de BMP-2..... | 138 |
| 5. | DISCUSIÓN..... | 146 |
| 6. | CONCLUSIONES..... | 157 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA..... | 161 |
| 8. | ANEXO..... | 183 |

I.INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. REGENERACIÓN ÓSEA

1.1.1. Definición

La regeneración ósea es un proceso fisiológico, complejo que supone la formación de hueso manifestándose durante la cicatrización normal de las lesiones óseas y está implicado en la continua remodelación del hueso durante la vida adulta (Eap y cols., 2015). Existen situaciones clínicas en las cuales se requieren grandes cantidades de estructura ósea, tales como los defectos óseos causados por la cirugía resectiva de tumores, traumatismos, infecciones, anomalías congénitas y enfermedades óseas, entre otros desórdenes, o bien, aquellos defectos en los que la regeneración ósea se encuentra comprometida, esto es, en casos de osteonecrosis, pseudoartrosis, osteoporosis o diabetes (Cheng y cols., 2013; Shang y cols., 2014; Wang y cols., 2014; Eap y cols., 2015; Kim y cols., 2017). Del mismo modo, diversos eventos traumáticos causan pérdida del hueso alveolar, entre los que destacan la pérdida de dientes, neumatización de los senos paranasales, enfermedad periodontal, traumatismos dentoalveolares, quistes y tumores odontogénicos y no odontogénicos y lesiones orales patológicas, entre otras afecciones (Tolstunov y cols., 2019). Todo ello supone un reto para el campo de la cirugía oral y maxilofacial y de la ortopedia ya que las estrategias que estimulan la curación ósea para reducir o tratar las complicaciones subyacentes están adquiriendo una notable importancia, debido al aumento de la esperanza de vida y al envejecimiento de la población mundial (Hashemibeni y cols., 2014; Romagnoli y cols., 2014; Wang y cols., 2014; Eap y cols., 2015; Jin y cols., 2019).

1.1.2. Tratamiento

El tratamiento clínico de los defectos óseos de tamaño crítico (DOTCs), es decir, aquellos defectos con la mínima longitud que no pueden cicatrizar espontáneamente y que resultan en la formación de tejido conjuntivo fibroso en lugar de tejido óseo cuando no se aplica ningún tratamiento, constituye el principal desafío para la cirugía reconstructiva, teniendo en cuenta que la regeneración ósea espontánea está limitada a los defectos de tamaño reducido, como es el caso de la regeneración ósea del hueso alveolar posterior a una extracción dental (Cheng y cols., 2013; Song y cols., 2015). Sin embargo,

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

las lesiones óseas que superan el tamaño crítico son difíciles de curar espontáneamente y muchos de estos casos acaban en cuadros de pseudoartrosis. Los mecanismos biológicos de la osteogénesis, la osteoconducción y la osteoinducción pueden ser usados para optimizar los enfoques terapéuticos con el fin de obtener un aumento del hueso. Algunos o todos de los siguientes principios son usados para mejorar los resultados de la regeneración ósea. La osteogénesis supone la transferencia directa de las células vitales originadas desde el material del injerto óseo al área donde se formará nuevo hueso. La osteoconducción sucede cuando el injerto actúa como un andamio para los procesos bioquímicos y celulares que darán lugar al establecimiento del nuevo hueso. La osteoinducción favorece la estimulación de las células mesenquimales para diferenciarse en osteoblastos con la subsecuente formación de hueso (Kim y cols., 2015; Baldwin y cols., 2019). Actualmente, los enfoques terapéuticos establecidos clínicamente para este tipo de defectos incluye el uso de injertos de origen natural, tales como injertos de hueso autólogo, alogénico y xenogénico o de origen sintético, como los sustitutos óseos aloplásticos solos o en combinación con membranas barreras (Wang y cols., 2014; Eap y cols., 2015; Song y cols., 2015; Baldwin y cols., 2019). Los injertos de hueso autólogo y alogénico actualmente suponen alrededor del 90% de los injertos realizados cada año, mientras que los injertos sintéticos o aloplásticos suponen el 10% restante (Weira y Hockin, 2010).

El autoinjerto representa el “sustituto ideal del tejido óseo” considerándose el “gold standard” para las estrategias terapéuticas de regeneración ósea, por el hecho que combina todos los componentes esenciales para inducir el crecimiento y la regeneración del hueso, ya que consta de células osteogénicas, factores de crecimiento osteoinductivos, matriz ósea y el suficiente aporte vascular para producir la formación de hueso. Además, por la ausencia de rechazo inmunológico y las excelentes propiedades de osteogenicidad, osteoinductividad y osteoconductividad ya que se trata de tejido del propio paciente (Romagnoli y cols., 2014; Wang y cols., 2014; Roseti y cols., 2017). Este tipo de injerto puede obtenerse a partir de zonas donantes extraorales e intraorales, siendo preferible esta última fuente para el tratamiento de defectos óseos localizados en mandíbulas parcialmente edéntulas (Kim y cols., 2015). Sin embargo, aunque presentan un bajo riesgo de reacción inmunológica y de transmisión de enfermedades, el injerto autólogo presenta características menos favorables, tal como, el suministro limitado por parte del

donante ya que se elimina hueso del propio paciente. Otras desventajas son la necesidad de llevar a cabo una segunda cirugía invasiva aumentando la morbilidad de la zona y el riesgo de fractura, infección, dolor crónico y alteración estética en el sitio donante. Todo ello constituye serios inconvenientes que pueden causar el fracaso del injerto (Hashemibeni y cols., 2014; Romagnoli y cols., 2014; Wang y cols., 2014; Kim y cols., 2015; Roseti y cols., 2017; Liu y cols., 2019).

Otra alternativa terapéutica es el uso de los aloinjertos obtenidos de cadáveres humanos o de donantes humanos vivos en la terapia de los defectos óseos, a pesar de que la disponibilidad ósea sea un problema menor y no abarque las complicaciones asociadas con la obtención del injerto, implica ciertos riesgos clínicos, entre los que se encuentran la transmisión de enfermedades, el riesgo de reacción inmunológica y la limitada capacidad para sobrevivir e integrarse a largo plazo después de su implantación (Romagnoli y cols., 2014; Wang y cols., 2014; Baldwin y cols., 2019; Liu y cols., 2019; Bow y cols., 2019). Otro inconveniente importante del injerto alogénico es su escasa calidad en lo referente a la actividad biológica y a las propiedades mecánicas que presenta (Song y cols., 2015; Wang y cols., 2014; Bow y cols., 2019). Del mismo modo, es necesario destacar que existen numerosos estudios sobre fracasos actuales de autoinjertos y aloinjertos en muchas condiciones patológicas (Romagnoli y cols., 2014).

Por otra parte, los xenoinjertos suponen el trasplante de tejido óseo a partir de otra especie biológica distinta a la humana. Han supuesto una atractiva alternativa a los injertos de origen humano, principalmente, por los menores costes de fabricación y mejora de la disponibilidad del material de origen. Debido a la fuente de origen del material, el riesgo de transmisión de enfermedades después de la implantación se reduce en gran medida puesto que su origen es diferente a la especie humana. No obstante, por esta razón, existe una mayor probabilidad de rechazo inmunológico por la presencia de elementos y proteínas extrañas. Con el objetivo de amortiguar los efectos derivados del inconveniente anteriormente comentado, el material es sometido a procesos de liofilización, desmineralización y esterilización que ocasionan la pérdida de factores osteoinductivos del injerto xenogénico (Rameshwar y cols., 2015; Bow y cols., 2019). Actualmente, el material de xenoinjerto más ampliamente utilizado es de origen bovino; sin embargo, aquellos derivados de tejido porcino están demostrando ser una gran

promesa debido a su arquitectura y similitudes en composición en comparación con el hueso humano (Bow y cols., 2019).

Así pues, el limitado éxito de los autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos en algunas situaciones clínicas ha propiciado la investigación de una amplia variedad de biomateriales y el desarrollo de diversas terapias clínicas (Romagnoli y cols., 2014; Wubneh y cols., 2018).

En los últimos años, los métodos de la ingeniería tisular ósea han sido considerados como un nuevo enfoque para reparar los defectos y para conseguir la regeneración tisular, constituyendo una alternativa a los injertos óseos (Cheng y cols., 2013; Hashemibeni y cols., 2014; Shang y cols., 2014; Song y cols., 2015; Wubneh y cols., 2018). La ingeniería tisular se define como un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y de la ciencia de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular. Junto con las células madre, los enfoques de la ingeniería tisular se han desarrollado y probado en varias aplicaciones clínicas, de modo que se usan actualmente para el tratamiento de ciertas enfermedades y trastornos. En la ortopedia y en la cirugía oral y maxilofacial, la ingeniería tisular ósea está considerada como un método prometedor para reemplazar a los injertos autólogos y alogénicos tan frecuentemente utilizados en estas áreas, desarrollándose rápidamente en las últimas dos décadas como resultado de los avances en la biología celular y en la investigación de la ciencia de los materiales (Wang y cols., 2014; Eap y cols., 2015; Wubneh y cols., 2018). El desarrollo de la ingeniería tisular ósea conlleva implícito un concepto estándar que implica tres factores íntimamente relacionados, estos son: matrices biorreabsorbibles, células madre y factores de crecimiento. Si bien, Giannoudis y cols., (Giannoudis y cols., 2007) añaden a este concepto la idea de “ambiente mecánico”, esto es, la importancia de la estabilidad mecánica como un factor clave en la curación del hueso y lo llamó “el concepto diamante” que comprende la presencia de cuatro factores interconectados: matriz osteoinductiva, células osteogénicas, factores de crecimiento y estabilidad mecánica (Klíma y cols., 2015). De este modo, dicha ingeniería tisular consiste en la construcción de biomateriales degradables que constituyan matrices porosas tridimensionales que sirvan como soporte estructural para el posterior trasplante de células madre mesenquimales que se adhieran, proliferen y diferencien en la matriz y, en algunos casos, en la incorporación de factores

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

de crecimiento adicionales para controlar el destino celular con el fin de generar y mantener la regeneración natural de la estructura ósea (Weira y Hockin, 2010; Cheng y cols., 2013; Wang y cols., 2014; Eap y cols., 2015).

Una regeneración ósea eficiente requiere que las células madre estén sometidas a una exposición continua a ciertos factores de crecimiento y durante un amplio periodo de tiempo, hasta la inducción de la formación de nuevo hueso (Eap y cols., 2015; Wubneh y cols., 2018). Estos factores son componentes opcionales de la ingeniería tisular ósea, desarrollando una importante función en la reparación de los defectos puesto que estimulan la osteogénesis y la angiogénesis en las células madre. De entre ellos, los factores de crecimiento más utilizados para inducir la formación de nuevo hueso son la proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2) y el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) (Giannoudis y cols., 2007) (Figura 1).

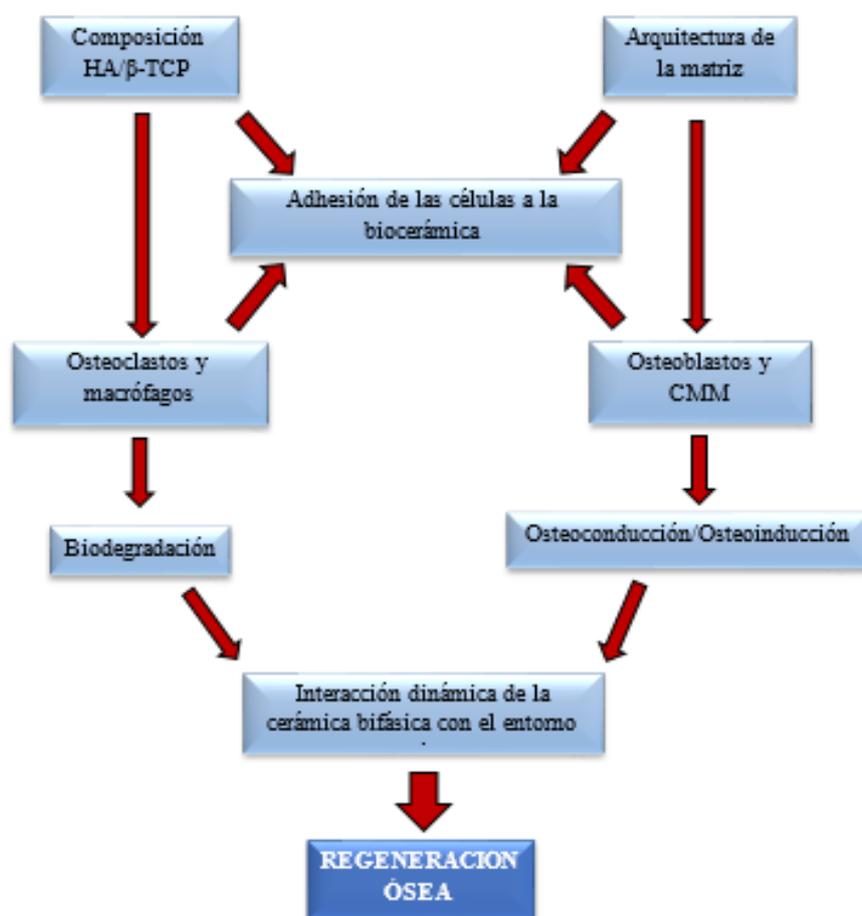


Figura 1. Fundamentos de la ingeniería tisular ósea

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

En consecuencia, los injertos óseos compuestos de células madres, matrices biorreabsorbibles y factores de crecimiento proporcionan, actualmente, una alternativa competitiva a los injertos de hueso autólogo (Eap y cols., 2015; Jin y cols., 2019). No obstante, a pesar de todo lo comentado anteriormente, existen ciertos retos que hacen de esta ingeniería un proceso con altos costes en lo referente a trabajo, dinero y tiempo empleado, tal como el procedimiento de cultivo, expansión y mantenimiento celular que serán explicados más adelante. La supervivencia celular y la vascularización son temas igualmente desafiantes, especialmente, cuando se intentan crear reconstrucciones óseas en defectos de tamaño crítico (Wang y cols., 2014). Además, es necesario tener en cuenta que las células humanas son extremadamente sensibles al medio de cultivo y a las señales de estimulación. La complejidad de la señalización con gradientes moleculares temporales y espaciales y los factores fisiológicos que afectan a la morfogénesis ósea, presentan, igualmente, significantes desafíos que tendrán que ser estudiados más a fondo para poder convertir a la ingeniería tisular en un tratamiento que pueda aplicarse rutinariamente en la clínica con el fin de restablecer un hueso funcional totalmente viable (Romagnoli y cols., 2014).

1.2. REGENERACIÓN ÓSEA Y OSTEOPOROSIS

1.2.1. Definición

La osteoporosis es una enfermedad sistémica crónica del metabolismo óseo que comprende un grupo heterogéneo de síndromes caracterizada por una reducción de la densidad mineral ósea (DMO), debido al desequilibrio entre la formación de los huesos por parte de los osteoblastos y de la reabsorción ósea llevada a cabo por los osteoclastos; esto conlleva al deterioro de la microarquitectura de los huesos, a una baja resistencia ósea y, por tanto, fragilidad ósea y aumento en el riesgo de fracturas (Paolucci y cols., 2016; Martínez-Reina y cols., 2019; Tanaka, 2019; Wang y cols., 2019). De este modo, de acuerdo con la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecida en 1994, la osteoporosis se define como una condición patológica que está caracterizada por una reducción de los niveles de densidad mineral ósea de 2'5 de desviación estándar de la media del valor de referencia (T-score= -2'5) para un adulto joven de treinta años del mismo sexo y raza, medidos en el mismo sitio anatómico y con la misma tecnología (Kerschán-Schindl, 2016; Permuy y cols., 2019). Si el contenido mineral del hueso se

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

sitúa en valores de 1 - 2'5 por debajo de la media, esta condición se denomina osteopenia. Es la enfermedad ósea con más prevalencia en la sociedad occidental y afecta negativamente a la calidad de vida de los pacientes (Donghyun, 2016; Barry y cols., 2016; Kersch-Schindl, 2016; Liu, 2016; Mardas y cols., 2016; Paolucci y cols., 2016; Pei y cols., 2016; Sun y cols., 2016; Takahashi y cols., 2016; Tao y cols., 2016).

1.2.2. Epidemiología

El creciente envejecimiento de la población mundial, sobre todo en los países desarrollados, resultado de la mejora en salud, bienestar, dieta y otros factores hace que la prevalencia de la osteoporosis crezca de manera constante, por lo que esta enfermedad afecta más frecuentemente a la población en edad avanzada (Barry y cols., 2016; Li y cols., 2016; Pei y cols., 2016; Takahashi y cols., 2016; Tando, 2016; Zimmermann y cols., 2016). Además de la edad, el sexo femenino es el factor de riesgo más significativo; de hecho, el 80% de los pacientes con osteoporosis son mujeres (Pei y cols., 2016). Cabe destacar que aunque la osteoporosis es más común en las mujeres que en los hombres, sobre todo en el periodo siguiente a la menopausia, el riesgo de mortalidad después de una fractura es mayor en los hombres osteoporóticos (Donghyun, 2016; Tando, 2016). Así, diversos estudios afirman que la osteoporosis en los hombres es promovida por factores como la edad o el hipogonadismo (Tando, 2016).

Como se comentaba anteriormente, esta enfermedad tiene especial importancia en los países industriales por el aumento de la esperanza de vida de sus habitantes gracias a los avances en la tecnología médica, pero también en las regiones del planeta donde dicha esperanza de vida aumenta drásticamente, tales como el sudeste asiático (Li y cols., 2016). Por lo que nos respecta, en Europa en el año 2010 se registró 27'6 millones de personas que sufren de osteoporosis, de ellos 22 millones son mujeres y 5'5 millones son hombres, encontrándose una mayor prevalencia en las mujeres caucásicas postmenopáusicas, como se ha comentado anteriormente (Li y cols., 2016; Mardas y cols., 2016; Kersch-Schindl, 2016; Paolucci y cols., 2016). Esto supone, según recientes estudios, que la prevalencia de osteoporosis y osteopenia es del 10 y 36% en los hombres de edad entre 60 y 79 años y de 18'5 y 44'7% en mujeres que se encuentran entre los 40 y los 79 años de edad (Paolucci y cols., 2016). Por lo tanto, esta elevada prevalencia se traduce en unos costes directos/año de 37 millones de euros (Kersch-Schindl, 2016). Del mismo modo,

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

se espera que su prevalencia aumente significativamente, al igual que la vida útil, duplicando su cifra para el año 2040 (Permuy y cols., 2019; Martínez-Reina y cols., 2019). Para contrarrestar esta tendencia, se han desarrollado numerosas terapias antirresortivas, incluyendo denosumab y bifosfonatos. Estas terapias disminuyen la reabsorción ósea osteoclástica atenuando el riesgo de fracturas osteoporóticas en pacientes menopáusicas (Martínez-Reina y cols., 2019).

Esta enfermedad crónica afecta a cualquier hueso del esqueleto, pero son la columna vertebral, las caderas, las muñecas, el húmero y las costillas los huesos que presentan una DMO más baja (Zimmermann y cols., 2016). Por otra parte, las localizaciones anatómicas que más comúnmente se fracturan por la fragilidad son los cuerpos vertebrales, el extremo proximal del fémur, el extremo distal del radio y los extremos proximales del húmero (Kersch-Schindl, 2016).

Por consiguiente, esta patología ósea puede ser clasificada en base a dos tipos: la forma primaria o la forma secundaria. La osteoporosis primaria se caracteriza por una progresiva pérdida de la mineralización ósea que forma parte de una alteración en la fisiología de las personas de edad avanzada y está influenciada por los cambios de las hormonas sexuales. Por otro lado, diferentes patologías y/o el uso de medicaciones específicas que afectan a la salud de los huesos, puede inducir la osteoporosis secundaria. Es necesario señalar que la forma primaria puede inducir osteoporosis secundaria.

De igual modo, la forma primaria de osteoporosis compromete la enfermedad posmenopáusica o senil (tipo I o II, respectivamente) siendo la forma más prevalente en los seres humanos (Pisani y cols., 2016; Permuy y cols., 2019). El tipo I de osteoporosis tiene lugar en un subgrupo de mujeres posmenopáusicas, normalmente en edades comprendidas entre los 50 y los 65 años, debido a la deficiencia de estrógenos y la consecuente reabsorción trabecular. La tasa de pérdida ósea en el primer año de expresión de la menopausia es realmente alta para luego continuar con un patrón lineal de aproximadamente 1% de pérdida ósea por año (Pisani y cols., 2016; Martínez-Reina y cols., 2019). En este grupo de mujeres, los patrones de fracturas afectan, principalmente, a la columna vertebral y a las muñecas. No hay evidencia de que la pérdida ósea en sí misma cause ningún síntoma, y por lo tanto, la disminución progresiva de hueso ha sido denominada “la epidemia silenciosa” o “el ladrón silencioso”. La morbilidad que

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

presentan las poblaciones osteoporóticas aumenta según el tipo de fractura. En la osteoporosis senil, hay una pérdida del equilibrio tanto de las porciones corticales como de las trabeculares del tejido óseo. Las fracturas de la cadera, del extremo proximal del húmero, la tibia y la pelvis representa fracturas características del tipo II de osteoporosis (Pisani y cols., 2016).

En lo relativo a la osteoporosis secundaria, que supone alrededor del 10% de los casos de enfermedad osteoporótica, se produce como consecuencia de la actuación de diferentes factores, tales como el tratamiento con glucocorticoides, desordenes endocrinos, patologías gastrointestinales, la inmovilización física a largo plazo y aquellos derivados del estilo de vida (Permuy y cols., 2019).

En lo referente al campo de la odontología, la influencia de la deficiencia de los huesos de la mandíbula atrae a investigadores y clínicos por lo que el número de estudios va en aumento cada año. Algunos estudios epidemiológicos han demostrado una correlación positiva entre la osteoporosis sistémica y algunas condiciones derivadas de la disminución de la densidad mineral ósea de la mandíbula tales como cambios visibles en las imágenes radiográficas de los cortes mandibulares, elevada reabsorción residual en la cresta y, en última instancia, la progresión en el número de dientes perdidos. Además, la densidad mineral ósea en los cóndilos mandibulares humanos medidos mediante tomografía computarizada, disminuye rápidamente una vez establecida la menopausia y, a su vez, está correlacionada con la densidad en las vértebras (Ejira y cols., 2008).

Por todo lo comentado anteriormente, esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública muy importante alrededor del mundo (Donghyun y cols., 2016). Así, la necesidad de buscar estrategias en la prevención y tratamiento de esta enfermedad cada vez es mayor debido al avance en nuestras sociedades y a la situación socioeconómica e individual (Donghyun y cols., 2016; Li y cols., 2016).

1.2.3. Etiología

La osteoporosis es una enfermedad multifactorial, aproximadamente el 69-88% del tejido óseo y de la calidad del hueso pueden deberse a factores genéticos mientras que la disminución de la calidad ósea a lo largo de la vida depende de factores asociados al estilo de vida (Li y cols., 2016).

En cuanto a los factores genéticos aún no se conocen con total claridad, hasta ahora se presupone que una gran cantidad de causas que pertenecen al campo de la epigenética influyen en la osteoporosis, por lo que actualmente existe una intensa investigación para encontrar más genes de riesgo ya que sólo se conoce una fracción de los mismos.

Por otra parte, en lo que se refiere a factores asociados al estilo de vida, estos son aún más importantes que la edad del paciente (Li y cols., 2016). Entre ellos se debe mencionar las deficiencias nutricionales y hormonales, el estilo de vida sedentario, el abuso de alcohol y de tabaco puesto que están implicados en la regulación de la regeneración ósea, las comorbilidades del paciente y el más importante, las enfermedades metabólicas tales como la diabetes y aquellas asociadas a inflamación crónica (artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica) (Li y cols., 2016; Liu y cols., 2016; Ma y cols., 2016). Además, es necesario tener en cuenta los fármacos que consume el individuo ya que son numerosos los medicamentos que influyen en el metabolismo óseo, tales como los glucocorticoides y los inhibidores de la bomba de protones. Al igual que los fármacos administrados en edades avanzadas tales como sedantes, psicotrópicos y analgésicos de acción central muy frecuentemente asociados con el riesgo de fractura. Así, la pérdida de masa ósea en el curso de la vida es dependiente al estilo de vida (Li y cols., 2016).

Cabe destacar que en personas de edad avanzada, la osteopenia y la sarcopenia se encuentran, normalmente, asociadas, por lo que el número y el tamaño de las fibras musculares están reducidas, y hay una pérdida preferente de fibras tipo II. Por consiguiente, la discapacidad parcial o completa relacionada con la edad también aumenta el riesgo de atrofia muscular y de pérdida de hueso, aumentando el riesgo de fracturas. Los ancianos tienen mayor riesgo de fractura ante cambios posturales debilitantes consecuencia de la osteoporosis que presentan y de la pérdida de unidades motoras de *Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis*

músculo funcional. Además, en este grupo poblacional, la pérdida de músculo puede contribuir a cambios esqueléticos relacionados con la osteoporosis. Igualmente, se ha sugerido que la debilidad muscular puede estar relacionada con una disminución progresiva del tejido óseo con la consecuente cifosis axial, incluso ante la ausencia de fracturas vertebrales (Paolucci y cols., 2016).

En cuanto a la falta de hormonas como causa de esta enfermedad, es necesario resaltar que además de la actividad de los osteoblastos y de los osteoclastos, las hormonas son fundamentales en la modulación de la remodelación ósea. Los estrógenos, la hormona paratiroidea y la testosterona desarrollan una importante función en dicho proceso (Barry y cols., 2016). Las recientes terapias para el tratamiento de cáncer de próstata y de mama han mejorado los resultados e incrementado la esperanza de vida de los pacientes; sin embargo, las terapias supresoras de hormonas para ambos tumores frecuentemente causan el desarrollo de osteoporosis, tal y como sucede en la deficiencia de testosterona por la terapia de supresión de andrógenos aplicada el cáncer de próstata originando el desarrollo de osteoporosis. Las fracturas por fragilidad ósea se ven ocasionalmente en estos pacientes, lo que sugiere que el control de la homeostasis ósea es crucial para el bienestar de los pacientes con cáncer tratados con terapias supresoras de hormonas. De hecho, el estrógeno se sintetiza a través de la testosterona y la deficiencia de esta hormona puede resultar en una pérdida de estrógeno (Tando y cols., 2016). Esta hormona ha sido descrita como el principal regulador del metabolismo óseo no solo en las mujeres sino también en los hombres ya que tanto los osteoblastos como los osteoclastos contienen sus receptores (Barry y cols., 2016; Tando y cols., 2016). Los estrógenos son hormonas importantes para el desarrollo sexual y reproductivo, sobre todo en las mujeres, puesto que la principal alteración en sus niveles se presenta durante la menopausia (Barry y cols., 2016; Ling-Ling y cols., 2016). Además, son decisivos en la formación de hueso, y junto con la vitamina D, el calcio y otras hormonas, intervienen en los procesos fisiológicos de remodelación de los huesos (Ling-Ling y cols., 2016). Así, el déficit de estrógenos, vitamina D y calcio aumenta la tasa de remodelado óseo y conlleva a un desequilibrio entre la formación y reabsorción ósea, dando lugar a una pérdida neta de hueso (Tando y cols., 2016). Por tanto, a medida que los niveles de estrógeno comienzan a disminuir en las mujeres de edad media, la capacidad para reconstruir el hueso, disminuye. En

consecuencia, en las mujeres posmenopáusicas, la cantidad de hueso que se degrada excede de aquel que se está reconstruyendo (Ling-Ling y cols., 2016).

Por otra parte, el estradiol ha demostrado que actúa como un inhibidor osteoclástico más potente que la testosterona, y, curiosamente, la pérdida ósea en hombres de edad avanzada está asociada con bajos niveles de estradiol (Tando y cols., 2016).

1.2.4. Patogenia

El hueso se compone de tejido duro rígido y es responsable de permitir las principales funciones del organismo. La capa más externa, el hueso cortical, es altamente resistente a la flexión y torsión y su principal función es resistir la carga que supone el peso del cuerpo. Por otra parte, el hueso esponjoso o trabecular está altamente vascularizado y contiene la médula ósea (Barry y cols., 2016). Así pues, el hueso es el principal tejido conectivo del cuerpo y se encuentra bajo un continuo proceso de remodelación y recambio (Liu y cols., 2016). La regeneración ósea está mediada por una interacción muy compleja regulada por los osteoclastos derivados de las células hematopoyéticas que se encargan de la reabsorción de los huesos y por los osteoblastos derivados de las células mesenquimales que llevan a cabo la formación ósea (Li y cols., 2016; Liu y cols., 2016; Sun y cols., 2016). De este modo, la resistencia del hueso está determinada por dos importantes características: la densidad ósea y la calidad del hueso. La DMO se define como el contenido mineral por área ósea proyectada (g/cm^2), mientras que la calidad ósea está relacionada con varias características del hueso, como la microarquitectura, el remodelado óseo, la acumulación de micro daños, la uniformidad de mineralización y la formación de colágeno. Por su parte, la integridad esquelética se mantiene a través de un equilibrio de reabsorción y formación ósea. El proceso de recambio óseo, llamado remodelado óseo, se mantiene a lo largo de la vida. La remodelación del hueso es un proceso secuencial y se inicia con la fase de “activación” definida como la conversión de la superficie ósea desde una situación de inactividad a otra de actividad, sobrevenida por la diferenciación de precursores de osteoclastos en osteoclastos maduros en la fase de “resorción”. A continuación, en la fase de reversión, los osteoclastos completan el proceso de reabsorción y producen señales que directa o indirectamente inician la formación ósea. Finalmente, en la fase de “formación”, las células mesenquimales se diferencian en osteoblastos funcionales para producir la matriz

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

del hueso. La duración de la fase de reabsorción es muy corta (2-4 semanas) en comparación con la fase de formación (4-6 meses) y la vida útil de los osteoclastos es mucho más corta que la de los osteoblastos (Liu y cols., 2016; Li-Ru y cols., 2019). Por tanto, un aumento de la remodelación ósea conduce a un aumento de la reabsorción ósea y a un balance negativo de la masa ósea total. La tasa de remodelación ósea aumenta el doble en la menopausia, triplica pasados trece años y permanece en niveles elevados en los pacientes osteoporóticos, contribuyendo al aumento de fragilidad ósea (Liu y cols., 2016; Tanaka, 2019).

De este modo, existe un delicado equilibrio entre estos dos procesos bajo condiciones homeostáticas, lo cual es necesario para el mantenimiento de una masa ósea constante y una renovación ininterrumpida del tejido óseo (Liu y cols., 2016). Así, en los individuos sanos, las funciones llevadas a cabo por osteoclastos y osteoblastos permite la reparación efectiva de fisuras y defectos resultantes de la actividad normal (Barry y cols., 2016). Sin embargo, las tasas de regeneración ósea disminuyen con la edad y ante ciertas condiciones patológicas, dando lugar a una disminución de la densidad mineral ósea (DMO) u osteoporosis como resultado final, además de otras enfermedades esqueléticas, incluyendo artritis reumatoide o metástasis de cáncer de hueso (Liu y cols., 2016; Kiernan y cols., 2016; Sun y cols., 2016). Por lo tanto, en un individuo osteoporótico, la función de los osteoclastos eclipsa la de los osteoblastos, y la región trabecular, en particular, pierde masa (Barry y cols., 2016; Jeon y Elisseeff, 2016; Takahashi y cols., 2016). Como resultado de la disminución de los puntos de conexión, el hueso se vuelve más frágil, lo que conlleva a un aumento del riesgo de fractura; condición asociada con el aumento del riesgo de mortalidad tanto en mujeres como en hombres (Barry y cols., 2016; Jeon y Elisseeff, 2016; Jia y cols., 2016; Ma y cols., 2016; Tando y cols., 2016; Zimmermann y cols., 2016).

Por consiguiente, el envejecimiento perjudica la curación del hueso osteoporótico fracturado por las alteraciones celulares relacionadas con la edad; en otras palabras, en un individuo osteoporótico existe un desequilibrio en la formación y reabsorción ósea lo que conlleva a una pérdida de volumen óseo, un aumento en la adiposidad de la médula ósea, una disminución de la integridad de la microarquitectura del hueso y una disminución en la proliferación y diferenciación de las células progenitoras osteoblásticas, así como de la angiogénesis, fundamental para la creación de nuevo hueso (Kiernan y cols., 2016; Jeon

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

y Elisseeff, 2016; Jia y cols., 2016). El tejido esquelético está altamente vascularizado, por lo que la remodelación ósea está estrechamente unida a la angiogénesis. La disminución de los niveles de los factores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), y la resultante reducción de la tasa de formación de los vasos sanguíneos del hueso, son las causas del escaso nivel de reparación ósea en la osteoporosis. Por lo tanto, las estrategias básicas para mejorar la regeneración ósea en los pacientes con osteoporosis son la promoción de la osteogénesis o la angiogénesis (Jia y cols., 2016).

Por otra parte, se ha demostrado que la osteoporosis puede aumentar significativamente los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en el citoplasma celular y en la mitocondria. Estas especies son unos importantes mediadores de la inflamación bajo condiciones patológicas. Sin embargo, la superproducción de ERO causa estrés oxidativo, por lo que son capaces de interrumpir el equilibrio oxidante/antioxidante celular que conduce a una lenta regeneración de los tejidos y cicatrización de las heridas pudiendo contribuir enormemente a la patogénesis de varias enfermedades, incluyendo la osteoporosis. El estrés oxidativo inducido por estímulos exógenos como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es capaz de inducir apoptosis de las células osteoblásticas e inhibir la diferenciación de los osteoblastos produciendo una disminución de la formación de hueso (Li y cols., 2016).

1.2.5. Cuadro clínico

La osteoporosis se manifiesta clínicamente como dolor crónico, fracturas y discapacidad física, resultando en una pérdida de la independencia y una necesidad de cuidados a largo plazo (Paolucci y cols., 2016). No obstante, la principal manifestación clínica de la osteoporosis es la aparición de fracturas (Kerschman-Schindl, 2016; Li y cols., 2016; Zimmermann y cols., 2016;), ya que mientras que las características óseas en los individuos sanos ocurre ante episodios traumáticos de alta energía (es decir, a altas velocidades de deformación), las fracturas óseas osteoporóticas se asocian con fracturas por fragilidad que ocurren con un traumatismo mínimo (es decir, a bajas velocidades de deformación) (Zimmerman y cols., 2016). Ello se traduce en limitaciones en la movilidad física y en la salud mental, por tanto produce una alteración de la locomoción y de la cognición, ocasionando una situación de dependencia hacia otras personas y hacia las

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

instituciones causando un deterioro significativo en la calidad de vida (Li y cols., 2016). En cuanto al dolor crónico puede resultar como consecuencia de deformidades esqueléticas, desequilibrio en las articulaciones y tensión en estructuras musculares, todas estas alteraciones son productos de la osteoporosis. A veces, el síntoma más común en los pacientes con osteoporosis es el dolor de espalda severo o intolerable. Los grandes estudios poblacionales han informado de la existencia de una relación entre el dolor de espalda lumbar y la osteoporosis, especialmente en los ancianos. Conforme avanza el tiempo, la fragilidad ósea puede acelerar el inicio de múltiples fracturas, causando una progresiva pérdida de la estatura y una continua contracción de los músculos paravertebrales con el mantenimiento de la postura. Esta secuencia de eventos resulta en fatiga muscular y dolor que puede persistir, incluso después de que las fracturas hayan curado (Paolucci y cols., 2016).

1.2.6. Diagnóstico

La alta incidencia de fracturas por osteoporosis hace que la atención deba estar centrada en la identificación de los pacientes con alto riesgo de fractura. De este modo, un gran número de técnicas pueden ser usadas para evaluar el riesgo de fractura. En general, se dividen en dos categorías principales: evaluación de los factores de riesgo clínicos y la medición física del tejido óseo (Pisani y cols., 2016). Si bien, una historia clínica detallada podría ayudarnos a identificar los factores de riesgo en la osteoporosis. Las causas potenciales para la osteoporosis secundaria son los desórdenes endocrinos, el hipogonadismo, enfermedades inflamatorias, desordenes de la médula ósea, la inmovilización, la malabsorción, el bajo peso corporal, el defecto en la síntesis de tejido conectivo o la ingesta regular de fármacos con un efecto negativo en el metabolismo óseo. Por otra parte, el examen clínico es indispensable. Este puede revelarnos un aumento anormal de pérdida de peso en comparación a la edad joven del paciente, un aumento de la cifosis o el típico “estómago osteoporótico”, todos ellos son indicadores de una posible fractura vertebral. Aún así, el diagnóstico se verifica mediante la medición de la densidad mineral ósea (DMO) (Kerschman-Schindl, 2016; Pisani y cols., 2016). La medida de la DMO se realiza mediante absorciometría dual de rayos X, es el método de elección para el diagnóstico de la osteoporosis. La cantidad de tejido óseo mineralizado se expresa como un T-score de 2.5 de desviación estándar por debajo de la media de la DMO en la columna vertebral o en la cadera de una población femenina sana mayor de 30 años de

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

edad. Al menos dos cuerpos vertebrales sanos son necesarios para obtener una información clara en las vértebras lumbares. En cuanto a la cadera, se deben escoger tres áreas (el cuello femoral, trocánter o total) para realizar un diagnóstico certero. Las imágenes radiográficas normalmente se realizan para identificar cambios morfológicos del esqueleto, así como para observar vasos sanguíneos calcificados o nódulos linfáticos para mejorar la precisión diagnóstica de la absorciometría dual de rayos X. La cantidad de DMO volumétrica medida con tomografía computerizada cuantitativa tiene la ventaja de dar información del hueso trabecular y cortical y no se ve modificada por vasos calcificados u otros tejidos cercanos. La evaluación cuantitativa de la masa ósea ha demostrado ser un fuerte predictor de las fracturas por fragilidad, pero la macro y la microarquitectura de las propiedades del material óseo, las microlesiones y el recambio óseo también son esenciales (Kersch-Schindl, 2016).

El análisis de los parámetros bioquímicos evalúa la etiología de la enfermedad (la diferenciación entre osteoporosis primaria y secundaria). Los marcadores del recambio óseo son componentes circulantes del metabolismo óseo y dan una señal en relación al riesgo individual de fractura (Kersch-Schindl, 2016).

Además, para medir la DMO también pueden ser muy útiles las herramientas que nos brindan diversas páginas web, las cuales realizan, igualmente, una predicción del riesgo de fractura de cada paciente. Muy popular es la Herramienta de Evaluación de Riesgo de Fractura desarrollada por la Organización Mundial de la Salud (FRAX). Es un medidor específico en cada país, que incluye 12 factores de riesgo diferentes y pueden ser usados sin tener conocimiento de la DMO. Esta herramienta calcula el riesgo de una fractura de cadera por osteoporosis en los siguientes 10 años (Kersch-Schindl, 2016).

Sin embargo, pese a todos los métodos diagnósticos anteriormente comentados, se espera que para el año 2050 el número de fracturas de cadera supere los 21 millones de personas alrededor del mundo. Hay, por tanto, una fuerte necesidad de evaluar los mejores enfoques terapéuticos con el fin de mitigar las patologías subyacentes a la osteoporosis que tanto incapacitan a los pacientes que la padecen (Pisani y cols., 2016).

1.2.7. Tratamiento

En el tratamiento de la osteoporosis existen una serie de estrategias cuyo principal objetivo es la regulación de la remodelación ósea con el fin de prevenir el mayor número de fracturas posible (Pisani y cols., 2016; Zimmermann y cols., 2016). La farmacoterapia ocupa un importante apartado en este campo, dirigida sobre todo a estimular el metabolismo óseo con el fin de mejorar la formación de hueso, al tratamiento adecuado del dolor y en situaciones de rehabilitación después de una fractura (Pisani y cols., 2016; Takahashi y cols., 2016).

Los fármacos anabólicos que mejoran la formación de hueso destacan la hormona paratiroidea de longitud completa (PTH 1-84) o su fragmento N-terminal, la teriparatida (PTH 1-34); sin embargo, ambos fármacos tienen graves efectos secundarios, entre los que destacan náuseas, diarreas e hipercalcemia. Por estos motivos, la terapia farmacológica de la osteoporosis se está centrando en el desarrollo de un sistema de administración de fármacos dirigidos a los osteoclastos (Jeon y Elisseff, 2016; Sun y cols., 2016). Así, dentro de este grupo de agentes farmacológicos encontramos a los bifosfonatos, los cuales ocupan un lugar destacado en la investigación centrada en prevenir la progresión de la osteoporosis (Barry y cols., 2016). Estos fármacos se han empleado en el tratamiento de la enfermedad ósea metastásica, la enfermedad de Paget, el mieloma múltiple, la hipercalcemia maligna y el cáncer de pecho. Los bifosfonatos actúan inhibiendo la actividad de los osteoclastos, y con ello la reabsorción ósea, deteniendo así la degeneración de hueso (Barry y cols., 2016; Donghyun y cols., 2016; Liu y cols., 2016; Tando y cols., 2016; Zimmermann y cols., 2016). Esta inhibición se debe a diversos efectos, entre los que se encuentran, la alteración citoesquelética, cambios en el transporte de proteínas intracelular, bloqueos de señales intracelulares en las vías de transducción e inducción de la apoptosis osteoclástica (Donghyun y cols., 2016). La tasa de reducción de las fracturas, sobre todo en zonas de hueso trabecular, al acabar el tratamiento con este fármaco ha sido atribuida a la reorganización en la estructura y en la composición del tejido óseo mediante la restauración de las características osteoblásticas y osteocíticas que contrarrestan la acumulación de microporosidad en el hueso (Zimmermann y cols., 2016). Sin embargo, este fármaco no está exento de efectos secundarios, efectos que se producen cuando los bifosfonatos se administran en altas dosis durante un largo periodo de tiempo. Por consiguiente, la excesiva inhibición de la

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

reabsorción ósea puede ocasionar un exceso de formación del hueso, lo que conlleva a su efecto más perjudicial, la necrosis mandibular. Al estar el recambio óseo alterado, se produce un desajuste en la reparación de los huesos dañados. Esto es especialmente frecuente en el hueso alveolar de los pacientes en tratamiento con bifosfonatos, puesto que este hueso tiene una tasa de conversión ósea de 3 a 10 veces mayor que otro tejido óseo en el organismo. Además, la mucosa oral, más débil y delgada que la mucosa de otras regiones corporales, puede verse, igualmente, afectada negativamente por este fármaco (Donghyun y cols., 2016). Igualmente, no es poco frecuente observar en estos pacientes la aparición de fracturas femorales atípicas asociadas con este tipo de tratamiento anti-reabsorción a largo plazo (Zimmermann y cols., 2016).

En resumen, debido a todas estas características desfavorables de los bifosfonatos sobre la salud general surgen preocupaciones relacionadas con su uso a largo plazo y han dado lugar a la creación de preguntas más profundas sobre el mecanismo de acción de estos agentes farmacológicos, lo que ha limitado su utilidad (Barry y cols., 2016; Zimmermann y cols., 2016).

No obstante, los estudios *in vitro* con este fármaco obtienen resultados prometedores, pero los mismos resultados no se observan cuando se trasladan a modelos animales *in vivo* (Barry y cols., 2016).

Otro método explorado en ensayos clínicos y preclínicos para estimular la creación de hueso, es el uso de factores de crecimiento como BMP-2. Aunque estos factores de crecimiento estimulan la formación ósea, se requieren dosis suprafisiológicas para alcanzar la eficiencia terapéutica. Esta dosis elevada lleva consigo, igualmente, efectos secundarios no deseados como la creación de hueso incontrolada, inflamación y tumorigénesis (Barry y cols., 2016). De igual modo, otros agentes farmacológicos que inhiben la reabsorción ósea como el denosumab u otros inhibidores osteoclasticos producen una fuerte inhibición de la actividad osteoclástica más allá de los niveles fisiológicos. Este mecanismo de acción da como resultado la estimulación de una condición, el recambio óseo, el cual se ve severamente suprimido lo que conduce a graves complicaciones como la osteonecrosis de los maxilares, la hipocalcemia o las fracturas femorales atípicas (Liu y cols., 2016; Tando y cols., 2016).

Otra opción terapéutica es la administración de calcio y vitamina D, componentes de la renovación del hueso. Si bien, su suplemento es limitado y no existe una efectividad consistente por lo que normalmente se utilizan como coadyuvantes en combinación con otros tratamientos (Liu y cols., 2016). Así mismo, el tratamiento con suplementos de testosterona también ha demostrado ser efectivo en el incremento la densidad mineral ósea en hombres con bajos niveles de testosterona en suero (Tando y cols., 2016). Sin embargo, a pesar que los estudios de terapias basadas en hormonas demostraron resultados prometedores; la administración prolongada de hormonas limita el potencial del tratamiento a largo plazo para estos pacientes (Barry y cols., 2016).

Por último, no debe menospreciarse el tratamiento de una de las principales manifestaciones clínicas de la osteoporosis: el abordaje del tratamiento del dolor crónico (Paolucci y cols., 2016; Tando y cols., 2016). Ello requiere un enfoque holístico que se centre en las características específicas de cada población, evaluando sus comorbilidades, estado mental, estado funcional y la independencia en la realización de las actividades diarias. Por lo tanto, el manejo del dolor debe incluir enfoques farmacológicos, intervenciones de fisioterapia, y menos frecuente, tratamiento quirúrgico. De igual modo, los tratamientos de rehabilitación basados en ejercicios con el fin de ayudar a controlar estos síntomas no generan efectos adversos significativos o contraindicaciones (Paolucci y cols., 2016).

Finalmente, por todas las complicaciones anteriormente comentadas que presentan las múltiples opciones de tratamiento disponibles actualmente para los pacientes con osteoporosis, se está investigando enfoques alternativos con biomateriales, especialmente con nanomateriales, para combatir la osteoporosis y estimular la regeneración ósea (Barry y cols., 2016; Liu y cols., 2016). Dicho esto, la terapia celular es una opción prometedora pero tiene muchos obstáculos intrínsecos para superarlos como son la poca capacidad para orientar a las células madre mesenquimales hacia una diferenciación osteogénica en el hueso osteoporótico y la incertidumbre del destino de las células después de la implantación (Liu y cols., 2016). Así pues, la ingeniería tisular ósea se ha convertido en un enfoque prometedor para la reparación de los defectos óseos en pacientes osteoporóticos (Pei y cols., 2016).

1.2.8. Inducción de la osteoporosis en modelos de experimentación animal

La inducción de la osteopenia y de la osteoporosis en los animales de laboratorio se puede llevar a cabo mediante distintas intervenciones experimentales. Así, la tasa de pérdida del tejido óseo en ratas hembras y macho depende del método usado para inducir la osteoporosis, del sitio analizado y si esta pérdida involucra al hueso cortical o trabecular. Todos los protocolos experimentales para inducir osteoporosis pueden ser implantados en ratas con independencia si su sistema esquelético está completamente mineralizado. Aunque las ratas alcanzan la madurez sexual a los 2 meses y medio, su esqueleto se considera maduro a partir de los 10 meses. Por tanto, es necesario tener en cuenta que si se utilizan ratas cuyos huesos no están completamente mineralizados, se obtendrá una baja DMO, hecho que se considera un factor de alto riesgo para las fracturas osteoporóticas humanas. No obstante, este tipo de modelo animal es apropiado para las investigaciones de factores endocrinos, nutricionales y medioambientales; mientras que las ratas con un tejido óseo completamente mineralizado son un modelo animal adecuado para las investigaciones en el campo de la osteoporosis (Lelovas y cols., 2008; Permuy y cols., 2019).

Como se mencionó anteriormente, existen diversas intervenciones para inducir la osteoporosis en dichos modelos animales, entre las que destacan:

1. Intervención hormonal, que puede ser quirúrgica o farmacológica.
2. Inmovilización conservadora o quirúrgica.
3. Intervención dietética mediante una dieta baja en calcio, abuso del alcohol u otras.

En primer lugar, en la intervención quirúrgica se distinguen la gonadectomía (ovariectomía en hembras y orquiectomía en machos), la hipofisectomía y la paratiroidectomía. La ovariectomía bilateral es la técnica más frecuentemente utilizada en las investigaciones sobre osteoporosis postmenopáusica (Lelovas y cols., 2008; Offermanns y cols., 2016). Con esta cirugía, inicialmente, la reabsorción ósea excede a la formación de hueso causando, por tanto, pérdida del tejido óseo. Poco después, la remodelación ósea alcanza un estado de equilibrio, donde la formación y reabsorción ósea están equilibradas. En el hueso cortical, una medida indirecta que nos indica esta disminución del hueso es el aumento de tamaño de la cavidad. Así, los primeros cambios

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

en el espesor del hueso cortical y en la cavidad medular de la diáfisis de la tibia y del fémur se observa a los 90-120 días después de la ovariectomía, mientras que el hueso cortical requiere 180 días o más después de la cirugía para alcanzar dicho estado de equilibrio (Lelovas y cols., 2008).

Los métodos alternativos a la ovariectomía quirúrgica que conducen a la supresión de estrógenos, tal y como se ha comentado anteriormente, son la administración de agentes farmacéuticos, como un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina, antagonistas de los receptores de estrógenos e inhibidores de aromatasa. Estos fármacos, que se usan en humanos para el tratamiento endocrino de la endometriosis o el cáncer de pecho están asociados con pérdida ósea acelerada. La administración de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina crea un modelo de hipogonadotropismo-hipogonadal, mientras que los antagonistas de los receptores de estrógenos y los inhibidores de la aromatasa producen un modelo hipergonadotrófico-hipogonadismo de osteoporosis. La experimentación en osteoporosis inducida por glucocorticoides ha obtenido resultados inconsistentes. Algunos estudios eran incapaces de detectar pérdida ósea en las ratas de experimentación, mientras que otros sí relacionaban la administración de glucocorticoides con la pérdida de tejido óseo (Lelovas y cols., 2008).

Otra técnica para inducir la osteoporosis en ratas es a través de la inmovilización. Hay varios métodos de inmovilización, que pueden ser quirúrgicos, como la resección de nervios, tendones o de la medula espinal o bien, de manera conservadora mediante vendajes inmovilizadores o suspensión de las extremidades. Debido al fenómeno de aceleración regional, la tasa de pérdida ósea es más rápida a través de los métodos quirúrgicos. En el modelo de inmovilización, la mayor pérdida ósea ocurre en las extremidades porque son los sitios de mayor carga mecánica pero, por lo general, la tasa de pérdida ósea es más rápida en el hueso trabecular que en el hueso cortical. Esta diferencia parece estar atribuida a la superficie del volumen que está aumentado en el hueso trabecular. Una de las características de este método es que los cambios óseos ocurren en la metáfisis de la tibia distal de las ratas, donde la arquitectura de esta zona es similar a los humanos adultos. La combinación de ovariectomía e inmovilización tienen las ventajas de ambos métodos, de manera que la pérdida ósea se consigue más rápidamente, especialmente en el hueso esponjoso (Lelovas y cols., 2008) (Figura 2).

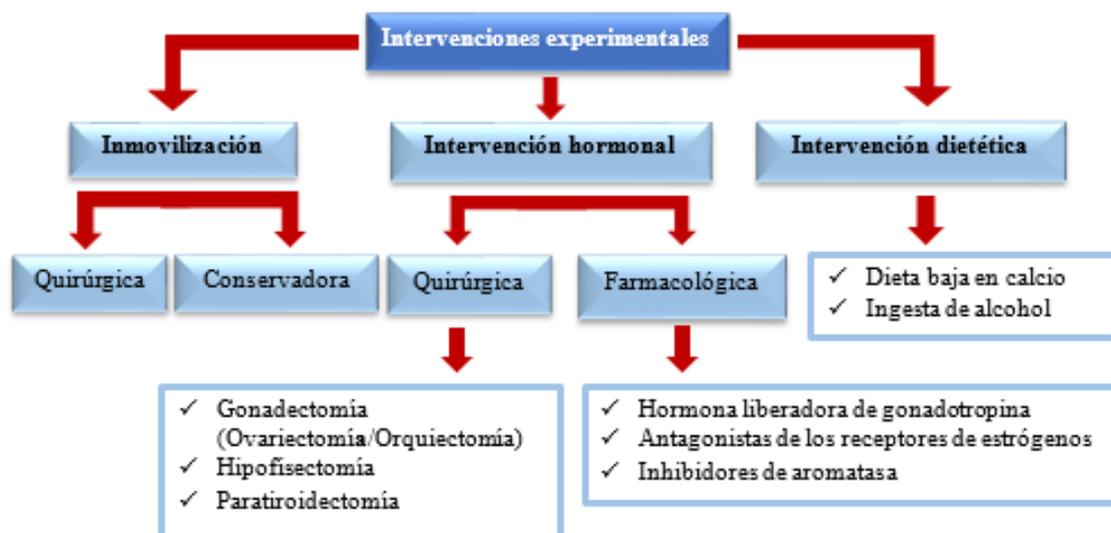


Figura 2. Métodos de inducción de osteoporosis en modelos animales

Finalmente, no está demás comentar que existen varios estudios enfocados en entender la patogénesis y severidad de la reducción de la cantidad ósea después de la ingesta de grandes cantidades de alcohol. Al igual que, la osteoporosis también puede ser estudiada después de la administración de una dieta baja en calcio, sobre todo en ratas con huesos no mineralizados (Lelovas y cols., 2008).

1.3. REGENERACIÓN ÓSEA Y DIABETES

1.3.1. Definición

La diabetes mellitus (DM), según la OMS, es una enfermedad crónica metabólica que se caracteriza por una alteración en la regulación del metabolismo glucídico que origina un estado de hiperglucemia debido a una acción insuficiente o a una secreción alterada de insulina (Li y cols., 2016; Liu y cols., 2015; Yu y cols., 2017). Esta enfermedad, a su vez, se encuentra asociada a ciertos trastornos, entre los que destacan retinopatía, nefropatía, osteoporosis y alteración de la curación ósea debido a que la diabetes mellitus puede generar un estado inflamatorio y destrucción de varios tejidos derivados de los cambios bioquímicos o metabólicos que conlleva (Li y cols., 2016; Qian y cols., 2015; Gadelkarim y cols., 2018; Wu y cols., 2019; Lekkala y cols., 2019).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

1.3.2. Epidemiología

En el año 2011, aproximadamente, 366 millones de personas padecían diabetes alrededor del mundo y para el año 2015, este número ascendió a 415 millones de personas (Epstein y cols., 2016; Picke y cols., 2016; Schaumann y cols., 2015). Se espera que para el año 2030, su prevalencia haya aumentado en torno a 552 millones de personas según la Federación Internacional de Diabetes (FID) (Schaumann y cols., 2015; Hamann y cols., 2012; Gadelkarim y cols., 2018). De este modo, al igual que sucede con la osteoporosis, su prevalencia va en aumento debido al envejecimiento de la población, al alto consumo de calorías y a la baja actividad física (Picke y cols., 2016). Por tanto, las secuelas asociadas con la diabetes estarán cada vez más extendidas en la población y serán cada vez más importantes en las próximas décadas (Yu y cols., 2016).

1.3.3. Etiología

Con el fin de distinguir el origen de la anomalía que origina la diabetes mellitus, se establece una clasificación de esta enfermedad, pudiendo clasificarse en diabetes tipo 1 (DM1) o diabetes tipo 2 (DM2) siendo los mecanismos responsables de estos cambios específicos en cada presentación (Qian y cols., 2015; Ho-Pham y cols., 2018; Lekkala y cols., 2019).

Por su parte, la DM1 es el tipo de diabetes en el que la destrucción de las células β del páncreas conduce a una deficiencia absoluta de insulina representando entre el 5-10% de los pacientes diabéticos y su tasa de prevalencia va en un aumento del 2-5% por año (Tebar-Massó y Escobar-Jiménez, 2009; Carvalho y cols., 2019). A su vez, se pueden reconocer dos subtipos: la DM mediada por inmunidad, consecuencia de una destrucción autoinmune de las células β del páncreas. De manera que aparecen en sangre diferentes anticuerpos, unos dirigidos contra las propias células, contra la insulina, contra la descarboxilasa del ácido glutámico o contra las enzimas tirosin-fosfatasa. El segundo tipo se corresponde a la DM idiopática, y tal y como hace referencia su nombre, se desconoce su etiología. En lo referente a la DM2, es el tipo más frecuente de diabetes, suponiendo el 90 - 95% de las diabetes diagnosticadas (Epstein y cols., 2016; Tebar-Massó y Escobar-Jiménez, 2009). Se caracteriza por la resistencia a la acción periférica de la insulina, por la secreción de insulina defectuosa o por ambas (Schaumann y cols., 2015; Tebar-Massó y Escobar-Jiménez, 2009; Qian y cols., 2015). Lo característico en *Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis*

este tipo de diabetes en el momento del diagnóstico es la multifactorialidad con ausencia de destrucción autoinmune de células β ; además de la obesidad abdominal, la cual está presente en más de un 85% de los diabéticos tipo 2 (Tebar-Massó y Escobar-Jiménez, 2009).

No obstante, existen otras clases de diabetes que no se incluyen en la clasificación principal dada su baja incidencia. Entre ellas, destaca la DM gestacional, definida por la aparición de intolerancia a la glucemia e hiperglucemia de gravedad variable no reconocida antes del embarazo. Entre otros tipos específicos de diabetes se encuentran los defectos genéticos de las células β cuya causa es un defecto genético que se hereda con patrón autosómico dominante. También, los defectos en la acción de la insulina de etiología genética producidas por alteraciones del receptor o a nivel post-receptor. Igualmente, enfermedades del páncreas exocrino producido por procesos que aconteciendo sobre el páncreas, pueden llegar a afectar el páncreas exocrino y producir DM, entre ellos las pancreatitis, algunos traumatismos graves o infecciones. Asimismo, las endocrinopatías, caracterizadas por la aparición de concentraciones anormales de hormonas contra-insulares o la DM inducida por fármacos u otras sustancias químicas, las cuales precipitan manifestaciones de alteraciones ya existentes, entre otros tipos (Tebar-Massó y Escobar-Jiménez, 2009).

1.3.4. Patogenia

Las complicaciones crónicas inducidas por la diabetes mellitus pueden afectar negativamente a múltiples tejidos, incluyendo a los huesos (Ardura y cols., 2016). Diversos estudios sobre las complicaciones de la diabetes mellitus han demostrado las extensas alteraciones sobre el metabolismo óseo y mineral (Gomes y cols., 2016). Así, tanto en la diabetes tipo 1 y 2, la estructura ósea se encuentra alterada, asociada con un aumento del riesgo de fractura ósea, una alteración de la curación de la herida y a enfermedades del sistema esquelético; lo cual reduce gravemente la calidad de vida de los pacientes (Ardura y cols., 2016; Liu y cols., 2015; Picke y cols., 2016; Qian y cols., 2015; Xu y cols., 2016). Todo ello se traduce en la aparición de osteopenia diabética (Gomes y cols., 2016). Así, los mecanismos subyacentes al deterioro de la calidad del hueso y, por consiguiente, a la capacidad de curación del mismo que se relacionan con la diabetes sigue pobremente definida (Gomes y cols., 2016; Picke y cols., 2016; Xu y cols.,

2016; Yu y cols., 2016). Sin embargo, una de las principales hipótesis para explicar la patogénesis de esta enfermedad ósea es la hiperglucemia crónica (Gomes y cols, 2016). Esta condición patológica produce una disminución de la vascularización y de los niveles de expresión de los genes necesarios para regenerar el hueso por un aumento de la inflamación sistémica y por una respuesta inflamatoria prolongada ante lesiones (Yu y cols., 2016). Igualmente, esta condición patológica puede incluir un aumento de los niveles circulatorios de uno de los inhibidores de la proteína Wnt, la esclerotina, un elevado nivel de los productos finales de glucosilación avanzada (PGA), además de una alteración de la dinámica de la inflamación y de la formación del callo óseo (Picke y cols., 2016; Xu y cols., 2016). En cuanto a los altos niveles de los productos finales de la glucosilación avanzada, estos inducen una disminución de los valores indicativos de estrés oxidativo en las células óseas debido a la ausencia del efecto compensatorio de los antioxidantes endógenos. Así, se considera que la pérdida de hueso podría haber ocurrido como resultado de la osteoclastogénesis activada, la osteoblastogénesis atenuada y la estimulación de la apoptosis de los osteoblastos, lo que podría estar inducido mediante el aumento de los niveles de los ERO. De este modo, la hiperglucemia puede ejercer un efecto perjudicial sobre las células óseas mediante el aumento del estrés oxidativo, caracterizado por un elevado nivel de ERO causando un desequilibrio en la reacción de oxidación-reducción intracelular, y, como consecuencia, inducir una disfunción celular (Gomes y cols., 2016). Por ende, la evidencia acumulada afirma que se produce una prolongada osteoclastogénesis, apoptosis de las células osteoblásticas, reducción en la síntesis de osteocalcina y una disminución en la proliferación y diferenciación de células madre mesenquimales, traducándose todo ello en una baja remodelación y formación ósea. (Gomes y cols., 2016; Li y cols., 2016; Xu y cols., 2016; Yu y cols., 2016). Asimismo, la hiperglucemia o la insulina pueden influir en la producción de citoquinas pro-inflamatorias o anti-inflamatorias lo cual afecta la proliferación, migración y diferenciación de las células del callo óseo, en particular a los osteoblastos u a otras células sanguíneas. Consecuentemente, un retraso en la expresión local de estos dos tipos de citoquinas puede afectar profundamente la maduración de los osteoblastos y de las células del cartílago. Este hecho reduce la osificación intramembranosa, la formación de hueso endocondral y la síntesis de la matriz ósea. Del mismo modo, los estudios experimentales han sugerido que el mal funcionamiento de los osteoclastos derivados de

la medula ósea puede contribuir a una disminución de la reabsorción del cartílago y a un retraso de la osificación endocondral (Xu y cols., 2016).

Mención aparte merece la neovascularización, donde la diabetes juega un papel esencial. Por una parte, puede observarse una excesiva vascularización, como sucede en la retinopatía y nefropatía diabética; pero por otro lado, existe una disminución de la neovascularización, por ejemplo, en el síndrome del pie diabético, en la disminución de la curación ósea, y en la enfermedad injerto contra huésped. Este fenómeno se conoce como la “paradoja diabética”. En cuanto a la alteración en la neovascularización causada por la diabetes, se conocen más de cien factores contribuyentes. Entre ellos, la desregulación de los factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y la enzima óxido nítrico sintetasa-2 (NOS). Otra razón para explicar la reducción de la capacidad angiogénica es la mayor diferenciación de las CMM en adipocitos (Schaumann y cols., 2015).

Por otra parte, la transformación del factor de crecimiento beta 1 (TGF- β 1) y de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) son dos factores importantes en el proceso de cicatrización de los huesos. La función que ejercen las citoquinas en la curación de la fractura ha generado un creciente interés en las distintas investigaciones. En dicho proceso, la expresión del factor de crecimiento similar a la insulina-2 (IGF-2), factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), factores de crecimiento y TGF se encuentran disminuidas en las ratas diabéticas. TGF-B1 y BMP-2 son un grupo de citoquinas multifuncionales que pueden inducir la proliferación, migración y diferenciación de las células mesenquimales originando la formación de cartílago y hueso. Por su parte, TGF-B1 regula el crecimiento y diferenciación de las células cartilaginosas y óseas y promueve la expresión de muchos factores de crecimiento en el tejido óseo y cartilaginoso. En estudios *in vitro*, tanto TGF-B1 y BMP-2 muestran una fuerte capacidad para estimular la diferenciación de osteoblastos y la inducción de la osificación, además de promover directamente la inducción de la reabsorción ósea mediante la estimulación de osteoclastos maduros. En pacientes diabéticos los niveles de estas dos citoquinas se encuentran disminuidos. Dicho en otras palabras, se sugiere que la diabetes puede inhibir la síntesis de TGF-B1 y BMP-2 y, consecuentemente, afectar a la formación de hueso y cartílago. Además, la alteración en la expresión local de estas citoquinas puede alterar la expresión

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

local de otras citoquinas; lo cual se traduce en una disminución en la formación ósea y en la reconstrucción de hueso, resultando en una curación de la fractura más lenta (Xu y cols., 2016).

No obstante, cabe destacar que, según varios estudios cualitativos, la DM tipo 1 se presenta con una disminución de la densidad mineral ósea originada, mientras que en los pacientes con DM tipo 2, dicha densidad se mantiene sin cambios o bien, se incrementa ligeramente (Ardura y cols., 2016; Qian y cols., 2015; Lekkala y cols., 2019).

La DM1 conlleva pérdida de cartílago y hueso al inducir alteraciones asociadas a una mayor concentración de glucosa en suero por una disminución en la secreción de insulina por las células β . La hipoinsulinemia puede afectar negativamente al metabolismo óseo (Carvalho y cols., 2019). Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* con modelos roedores indican que la actividad osteoblástica se encuentra disminuida, reduciendo la acumulación de masa ósea mientras que se mantiene la actividad de los osteoclastos liberando osteocalcina subcarboxilada al flujo sanguíneo, que a su vez afecta la homeostasis de la glucosa (Lekkala y cols., 2019; Hamann y cols., 2012; Carvalho y cols., 2019). Esta disminución de la DMO hace establecer la hipótesis del efecto osteoanabólico de la insulina sobre los osteoblastos a través de mecanismos mediados por ciertos receptores. Así, en diversos estudios se ha establecido una correlación directa entre la reducción de insulina y la baja masa ósea en el mismo individuo. De modo que el tratamiento antidiabético se asoció con una mejora sustancial de la matriz mineral del hueso y de los biomarcadores del proceso de remodelación ósea (Hamann y cols., 2012). Por consiguiente, este hecho se evidencia en pacientes con DM1 mediante diversos marcadores: bajos niveles de osteocalcina (marcador de la formación ósea), de CTX (marcador de la reabsorción ósea) y aumento de la esclerostina (potente inhibidor de las vías de señalización Wnt); así como la expresión de factores de transcripción osteoblásticas, por ejemplo RUNX2 y otros marcadores bioquímicos e índices histomorfométricos (Hamann y cols., 2012; Lekkala y cols., 2019). Además, en estos pacientes se han observado ciertos efectos como la inflamación autoinmune y bajos niveles de factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), osteocalcina y vitamina D pudiendo contribuir, igualmente, a la fragilidad del tejido óseo (Lekkala y cols., 2019). Por otra parte, este ambiente hiperglucémico produce la formación de los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) (Carvalho y cols., 2019). Estas proteínas o

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

lípidos tienen efectos acumulativos que aumentan con la edad, representando un papel clave en la enfermedad vascular asociada a la diabetes; lo que conlleva a una alteración directa e indirecta de las propiedades de la matriz ósea (Hamann y cols., 2012; Lekkala y cols., 2019; Carvalho y cols., 2019). Por tanto, las propiedades mecánicas del hueso diabético tipo I son similares a las de un hueso anciano en un entorno no diabético (Lekkala y cols., 2019). El receptor para los AGE (RAGE), presente en osteoblastos, osteoclastos y condrocitos, es el intermediario molecular que activa las señales que conllevan al estrés oxidativo y la inflamación. Los RAGEs están involucrados con el aumento de la actividad inflamatoria y la disminución en la formación de hueso; puesto que conducen a una disminución en la proliferación y posterior apoptosis de los osteoblastos y mayor activación de los osteoclastos; así como apoptosis de condrocitos en el cartílago. Igualmente, tanto los pacientes como los modelos de ratones con DM1 muestran una rápida pérdida de peso durante el inicio de la enfermedad y, además, si no es tratada se crea un estado que resulta en una pérdida de grasa y proteínas. Esta estrecha relación entre tejido adiposo y tejido óseo parece estar explicada por la secreción de leptina por parte de los adipocitos. La leptina produce un desequilibrio en la formación de hueso, exhibiendo una disminución del volumen óseo cortical por lo que los pacientes diabéticos tipo I presentan un mayor volumen óseo trabecular. Se ha establecido que la unión de la leptina a sus receptores en el hipotálamo aumenta la expresión de noradrenalina activando la vía de los receptores adrenérgicos β_2 en los osteoblastos, inhibiendo la formación de hueso y aumentando la expresión de los receptores activadores del factor nuclear κB que promueve la diferenciación y proliferación de los osteoclastos (Carvalho y cols., 2019). Un aumento de la osteoclastogénesis bajo condiciones hiperglucémicas se manifiesta en un aumento de los genes relacionados con los osteoclastos, como la catepsina K y la fosfatasa ácido resistente al tartrato (FATR) y en un incremento del número de osteoclastos en el hueso alveolar y trabecular (Shen y cols., 2019). En efecto, los estudios sobre las complicaciones asociadas a la DM1 han demostrado un enlace consistente entre complicaciones microvasculares y alteraciones en la estructura ósea. Sin embargo, aún no es evidente si estas alteraciones en pacientes con DM1 resultan de la microangiopatía por la enfermedad microvascular que produce una reducción en el flujo sanguíneo y una alteración del remodelado del tejido óseo estando asociada a un aumento del estrés oxidativo, daño en el ADN y activación de la apoptosis de las células de la médula ósea o por cambios celulares y moleculares causados por una

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

hiperglucemia controlada. Además de la insulina, las células β pancreáticas producen otros factores osteoporóticos, como el polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) y preptina, miembros de la familia de péptidos relacionados con el gen de la calcitonina. La producción de estos péptidos se encuentra ausente en pacientes con DM1 (Hamann y cols., 2012).

En contraste a la DM1, que está caracterizada por un bloqueo de la producción de insulina, la DM2 se desarrolla en respuesta a la resistencia a la insulina. La DM2 se caracteriza por hiperglucemia e hiperinsulinemia que produce un efecto negativo sobre las propiedades óseas. Por una parte, la hiperglucemia interrumpe la remodelación del hueso llevada a cabo por osteoblastos y osteoclastos (Hamann y cols., 2012; Lekkala y cols., 2019). Además, un exceso de glucosa puede alterar las propiedades del hueso a través de la acumulación de AGE y los efectos posteriores consecuencia de la interacción AGE-RAGE. Por otra parte, la insulina es un agente anabólico y la hiperinsulinemia puede ayudar a explicar la mayor densidad mineral ósea observada en pacientes con DM2. Además, la señalización de la insulina ayuda a regular la proliferación de osteoblastos y a mantener la osteoclastogénesis (Lekkala y cols., 2019). De este modo, los pacientes con DM2 tienen un mayor peso corporal debido, sobre todo, a una mayor densidad mineral ósea (con T-score 0'3-0'8, es decir, unos valores más altos que en aquellos casos controles sin diabetes mellitus para la misma edad y peso) que los pacientes no diabéticos (Hamann y cols., 2012; Ho-Pham y cols., 2018). De esta manera, es de esperar que los pacientes DM2 tengan un menor riesgo de fractura. Sin embargo, estudios observacionales han encontrado que aunque los pacientes con DM2 tengan una mejor densidad mineral ósea, su riesgo de fractura es mayor que los no diabéticos (Hamann y cols., 2012; Ho-Pham y cols., 2018; Lekkala y cols., 2019). Es necesario tener en cuenta que los estudios sobre la asociación entre diabetes y salud ósea tienen dos dificultades que están relacionadas con la medicación y la medición de la composición ósea. El principal factor de confusión es que la medicación antidiabética tiene efectos adversos sobre el metabolismo óseo (Hamann y cols., 2012; Ho-Pham y cols., 2018). Algunos antidiabéticos orales podrían dirigirse específicamente a los osteoblastos y afectar así a la formación de hueso. La metformina estimula la diferenciación de osteoblastos mediante la transactivación de RUNX2. Las glitazonas activan el receptor omega, activador del proliferador de peroxisoma que podría desplazar las células precursoras hacia el linaje adipocítico a costa

de la formación de osteoblastos (Hamann y cols., 2012). Además, la mayoría de los estudios usaron absorciometría dual de rayos X, tecnología para medir la DMO que no distingue entre densidad mineral cortical y trabecular siendo la primera el principal determinante de la resistencia ósea (Ho-Pham y cols., 2018). Una serie de factores que comprenden hiperglucemia, estrés oxidativo, citoquinas y adipocinas inflamatorias derivadas de la materia grasa y AGE inhiben, colectivamente, la función de los osteocitos, alterando el recambio óseo y degradando las propiedades del colágeno. Todo ello altera la calidad ósea que puede contribuir a una disminución de la resistencia a las fracturas por la alteración de la microarquitectura ósea y de la remodelación ósea, así como de las propiedades de la matriz de colágeno por la acumulación de AGE (Morgan y cols., 2018; Lekkala y cols., 2019). La acumulación de los AGE mediante glicación no enzimática, una reacción espontánea entre residuos ácidos amino en las fibras colágenas y azúcares extracelulares, pueden conducir a una pobre composición de la matriz del tejido óseo. Así, dicha acumulación afecta negativamente a las propiedades mecánicas, lo que puede contribuir a un aumento de la fragilidad esquelética (Karim y cols., 2018). Además, los AGE al interactuar con el RAGE inducen estrés oxidativo e inflamación (Lekkala y cols., 2019).

No obstante, se presupone que los individuos con DM2 no diagnosticada tienen mayor cantidad de masa grasa pero pobre densidad ósea cortical lo que conlleva a una reducción de la resistencia de los huesos y, por tanto, alto riesgo de fractura por fragilidad. De este modo, la mayor densidad ósea trabecular y la pobre densidad cortical se traduce en un menor índice de estrés de resistencia ósea siendo un importante predictor del riesgo de fractura (Ho-Pham y cols., 2018). No obstante, todavía no se conoce la medida en que la remodelación ósea y las propiedades materiales están afectadas por los efectos simultáneos de la hiperglucemia, la acumulación de AGE y la hiperinsulinemia (Lekkala y cols., 2019).

En definitiva, tal y como se ha demostrado, la diabetes afecta las propiedades biomecánicas del hueso disminuyendo la fuerza mecánica, la resistencia a la flexión y la rigidez a la torsión. A todo ello debe añadirse las alteraciones en el esqueleto asociadas a la edad (osteoporosis tipo II), aumentando aún más la fragilidad ósea en pacientes diabéticos de edad avanzada (Xu y cols., 2016).

1.3.5. Cuadro clínico

En lo referente a la clínica de la DM1, los síntomas cardinales son atribuibles a la hiperglucemia de días o semanas de evolución. En concreto son: poliuria, polidipsia, polifagia, astenia y pérdida de peso. Una de las complicaciones metabólicas agudas más graves es la cetoacidosis diabética, causada por un déficit relativo o absoluto de insulina y un incremento concomitante de las hormonas contrainsulares y caracterizada por la triada de hiperglucemia, cetosis y acidosis metabólica. Por su parte, la mayor parte de los casos de DM2 se producen en el contexto del llamado síndrome metabólico. Este síndrome se caracteriza por la presencia de insulinoresistencia e hiperinsulinismo compensador asociado a trastornos del metabolismo hidrocarbonado, cifras elevadas de presión arterial, alteraciones lipídicas y obesidad, con un incremento de la morbimortalidad de origen aterosclerótico. La clínica cardinal de la DM2, entre la que encontramos debilidad, poliuria o polidipsia se presenta frecuentemente de forma insidiosa a lo largo de semanas o meses. No obstante, independientemente de la clase de DM, los pacientes presentan una elevada tasa de fracturas óseas debido al impacto tan negativo que tiene esta entidad sobre la fisiología ósea (Tebar-Massó y Escobar-Jiménez, 2009).

1.3.6. Diagnóstico

Al diagnóstico de la DM se puede llegar por tres vías:

1. La medición de la glucosa plasmática en ayunas: si la glucemia plasmática en ayunas es ≥ 126 mg/dl es diagnóstica de DM. No obstante, en ausencia de una hiperglucemia inequívoca, es recomendable repetir la prueba otro día.
2. Los síntomas de DM (poliuria, polidipsia, polifagia, astenia y/o pérdida de peso) y una glucemia plasmática en cualquier momento del día y sin relación con ayuno o ingesta previa ≥ 200 mg/dl son suficientes para el diagnóstico de DM.
3. Glucemia plasmática a las 2 horas de la tolerancia oral a la glucosa con 75g de glucosa ≥ 200 mg/dl. Este diagnóstico debería ser confirmado y considerado provisional mientras tanto. Para la confirmación no debe usarse la hemoglobina glicosilada (HbA1c) (Tebar-Massó y Escobar-Jiménez, 2009).
- 4.

1.3.7. Tratamiento

El tratamiento de los pacientes con DM consiste en educación sobre pautas de estilo de vida saludables, evaluación de la posibilidad de complicaciones micro y macrovasculares (retinopatía, nefropatía, neuropatía y enfermedad coronaria), normalización de la glucemia, reducción de los factores de riesgo cardiovasculares y omisión de fármacos que pueden agravar las anomalías del metabolismo insulínico y lipídico. La DM2 presenta en su historia natural una serie de transformaciones en su fisiopatología, por lo que resulta imprescindible que adaptemos el tratamiento a su curso evolutivo. Así, además del consejo dietético y la actividad física, el tratamiento inicial en la mayoría de pacientes con DM2 debe incluir metformina, ya que este tratamiento puede inducir la normoglucesmia si el cumplimiento es óptimo. Si existen contraindicaciones se podría considerar una sulfonilurea de corta duración, como terapia inicial, siempre acompañada de cambios en el estilo de vida en el momento del diagnóstico, de cara a contrarrestar la ganancia de peso que, generalmente, se asocia al tratamiento con sulfonilureas. Para pacientes que no toleran o no son candidatos a metformina o a sulfonilureas, la repaglinida es una alternativa razonable, sobre todo, en pacientes con enfermedad renal crónica. Otra terapia alternativa es una tiazolidinediona para pacientes con valores iniciales bajos de HbA1c o si hay contraindicaciones específicas a las sulfonilureas. En pacientes intolerantes o aquellos en los que la metformina, sulfonilureas o tiazolidinedonas están contraindicadas, se puede considerar la sitagliptina, inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4). En lo que respecta a la insulina también puede ser considerada como primera línea terapéutica en todos los pacientes con DM2, sobre todo, aquellos que presentan una HbA1c > 10%, glucemia en ayunas > 200 mg/dl, determinaciones de glucemia persistentemente > 300 mg/dl o cetonuria. Aunque no es aconsejable utilizar insulinas premezcladas en el tratamiento de la DM1, es una opción razonable en los pacientes con DM2. Los regímenes más complejos de insulina pueden usarse en los pacientes con DM2 para intentar conseguir la normoglucesmia, añadiendo insulina de acción rápida o ultrarrápida, antes de las comidas. Cabe destacar que en los pacientes con DM2 y resistencia elevada a la insulina requieren un tratamiento con fármacos insulinosensibilizadores asociados a la insulina para conseguir un control glucémico aceptable. Por otra parte, la terapia farmacológica para perder peso también puede usarse en los pacientes con DM2. Finalmente, el tratamiento quirúrgico de los

pacientes obesos con diabetes provoca el mayor grado de disminución de peso a largo plazo y la mejoría más importante en el control glucémico (Tebar-Massó y Escobar-Jiménez, 2009).

1.3.8. Inducción de la diabetes en modelos de experimentación animal

La DM puede reproducirse en animales de experimentación mediante diversos métodos, entre los que podemos distinguir la inducción hormonal, la administración de fármacos y la manipulación genética (Arias-Díaz y Balibrea, 2007; King, 2012) (Figura 3). Actualmente, la técnica más importante y más frecuentemente utilizada es el empleo de fármacos destacando el aloxano y la estreptozotocina.



Figura 3. Metodos de inducción de diabetes en modelos animales

1.3.8.1. Inducción hormonal

La administración de corticoides en diversos períodos de la vida del animal puede causar un estado similar a la DM2 humana, este modelo sería especialmente apropiado para el estudio de la DM2 que aparece en humanos trasplantados o en el tratamiento esteroideo crónico de otra causa (Arias-Díaz y Balibrea, 2007). Otras hormonas que pueden causar hiperglucemia en animales de experimentación son la somatostatina, el glucagón, las catecolaminas y la tiroxina (Arias-Díaz y Balibrea, 2007; King, 2012).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

1.3.8.2. Administración de fármacos

Otros modelos están basados en la administración de determinadas sustancias con efectos tóxicos sobre las células. Tal es el caso de la estreptozotocina (STZ), un antibiótico utilizado en la quimioterapia del cáncer que induce DM2 en roedores mediante destrucción celular. Otro fármaco utilizado a veces con el mismo fin es el aloxano. Por su parte, la STZ es un derivado de la nitrosourea aislado del *Streptomyces achromogenes* con actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro. Se trata de un potente agente alquilante que interfiere con el transporte de glucosa y con la función de la glucokinasa, e induce múltiples puntos de ruptura en doble hélice del ADN. La molécula de la STZ consta esencialmente de glucosa ligada a un fragmento reactivo de nitrosourea, y como tal es internalizada a través de los transportadores celulares de glucosa. Una vez dentro, el fragmento de nitrosourea es liberado y ejerce su actividad tóxica. Dado que las células pancreáticas son más activas que las demás en la captación de glucosa (tienen que monitorizar continuamente sus niveles plasmáticos), también resultan más sensibles al efecto tóxico de la STZ (Arias-Díaz y Balibrea, 2007; King, 2012). La sensibilidad a la STZ varía según la especie animal, la cepa, el sexo, la edad y el estado nutricional. El modo y ruta de su administración resultan determinantes para su efecto. Una única dosis importante de estreptozotocina puede inducir diabetes en roedores, probablemente debido a efecto tóxico directo. De modo alternativo, se puede usar en forma de múltiples dosis pequeñas (p. ej., 40 mg/kg en 5 días consecutivos). La principal ventaja de los modelos basados en la administración de fármacos es que el grado de alteración de las células puede ser regulado de acuerdo con la dosis de toxina administrada. Su gran desventaja reside en que rara vez la diabetes humana es causada por un tóxico de este tipo (Arias-Díaz y Balibrea, 2007).

1.3.8.3. Manipulación genética

La introducción de las técnicas de biología molecular dio lugar a la aparición de un gran número de modelos animales útiles para el estudio de la DM2. Al modificar genes específicos, dichas técnicas permiten producir ratones que sobreexpresen o carezcan de una proteína determinada, que se sospeche que ejerzan alguna función en el metabolismo de la glucosa (Arias-Díaz y Balibrea, 2007; King, 2012). Este tipo de modelos se ha desarrollado especialmente en ratones debido a que hay más herramientas moleculares y

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

tecnologías disponibles para esta especie. Los tipos de manipulaciones que afectan a un gen específico y que pueden interesar para producir un modelo diabético son: a) sobreexpresión, da lugar a ratones llamados transgénicos, b) eliminación, obtiene ratones llamados “knock-out” y c) reemplazo, produciendo ratones llamados “knock-in” (Arias-Díaz y Balibrea, 2007).

1.4. REGENERACIÓN ÓSEA Y OSTEOPOROSIS + DIABETES

El número de investigaciones que relacionan diabetes y osteoporosis ha crecido exponencialmente en los últimos años, no sólo por el significativo aumento en la incidencia de estas dos enfermedades debido al aumento de la esperanza de vida en las sociedades occidentales, sino también porque ambas comparten una característica fundamental: la fragilidad ósea. Los motivos de esta mayor fragilidad no están totalmente dilucidados, aunque sí se han observado diferencias estructurales en el hueso de los pacientes con DM1 y DM2. Así, diversos estudios afirman que en la DM1 existe una marcada disminución de la DMO, lo que, evidentemente, explica una peor regeneración ósea en estos pacientes; mientras que en la DM2 la DMO se encuentra en niveles normales e incluso, levemente incrementados. Por ello, en este grupo de DM intervienen una gran variedad de factores que ejercen un efecto negativo en la regeneración ósea. Entre ellos, destaca la mayor porosidad de la cortical ósea en pacientes diabéticos respecto de aquellos que no lo son. Estudios sugieren que la porosidad cortical podría estar causada por un compromiso de la vascularización en la capa cortical, consecuencia de la microangiopatía diabética, aumentando así el riesgo de fractura ósea. Igualmente, estudios experimentales y clínicos proporcionan evidencia que la acumulación de los productos finales de la glicosilación avanzada (PGA) en el colágeno del hueso diabético contribuye a reducir las propiedades mecánicas óseas y por tanto, a un mayor aumento de la susceptibilidad a la fractura. El estado de hiperglucemia al que están expuestos los pacientes con DM2 induce la formación de una base de Schiff de cuyos productos de intermediación se forman dicarbonilos altamente reactivos. Estos dicarbonilos y las cadenas laterales de NH_2 pueden conllevar a la producción de PGA irreversibles tales como $\text{N}\epsilon$ -carboximetil-lisina y pentosidina. La acumulación de estos productos estimula la formación de colágeno defectuoso debido a la creación de enlaces cruzados irreversibles entre las fibras de colágeno que interfieren en el desarrollo de la matriz de colágeno, además de producir una alteración en la función de los osteoblastos (Epstein y cols., 2016; Wang y cols.,

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

2016). Adicionalmente, el aumento de receptores de PGA circulantes, localizados en los osteoblastos y en las células inmunológicas, aumentan la producción de citoquinas inflamatorias y de ERO, relacionados con un incremento en la reabsorción ósea y con cambios estructurales a través de modificaciones posteriores a la traducción (Epstein y cols., 2016; Wang y cols., 2016). La hiperglucemia aguda y crónica disminuye la regulación en la expresión y actividad de la osteocalcina (OCN), disminuyendo la absorción de calcio en los cultivos de osteoblastos, mientras que aumenta la expresión de receptor de peroxisoma proliferador activado gamma (PPAR γ). Este receptor aumenta la diferenciación en adipocitos, independientemente de la diferenciación de las CMM-MO hacia la línea osteoblástica (Epstein y cols., 2016; Wang y cols., 2016). Esta osteodistrofia diabética se complica aún más por el efecto que inducen los bajos niveles de vitamina D, esto es, alteración en el suplemento vascular y neuropatía. Del mismo modo, los factores asociados al del estilo de vida y los fármacos hipoglucemiantes pueden alterar las propiedades del hueso. Así, la pérdida de peso, que está fuertemente asociada como terapia de primera línea en pacientes diabéticos, puede estar implicada en el aumento de las tasas de reabsorción ósea (Epstein y cols., 2016; Wang y cols., 2016). Del mismo modo, es importante destacar medicaciones comúnmente usadas para el tratamiento de la diabetes tales como la tiazolidinedionas (TZD), las sulfonilureas y la insulina (Epstein y cols., 2016; Wang y cols., 2016). Al contrario, muchos estudios informan que la metformina aumenta de manera dosis-dependiente la proliferación de células similares a osteoblastos y promueve la diferenciación osteoblástica *in vitro*, y algunos investigadores muestran un aumento de la expresión de colágeno-1 y del ARN mensajero de la osteocalcina, estimulando la actividad de la fosfatasa alcalina y mejorando la mineralización celular. Por su parte, la insulina interviene en la relación diabetes-metabolismo óseo ya que induce la síntesis del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), el cual tiene una estructura homóloga a la insulina interviniendo en la vías de señalización de la reconstrucción ósea (Wang y cols., 2016).

El control excesivo de la glucosa en sangre produce un estado de hipoglucemia implicando un deterioro cognitivo y mareos asociados a la mala visión (retinopatía diabética) y a la neuropatía periférica aumentando el riesgo de caídas, elevando así la tasa de mortalidad de la osteoporosis (Epstein y cols., 2016; Wang y cols., 2016). Recientemente, se ha desarrollado una nueva clase de medicamento para tratar la diabetes,

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

son los inhibidores de SGLT-1 y SGLT-2 que actúan bloqueando la captación de glucosa intestinal y la reabsorción de glucosa renal a través de los transportadores sodio-glucosa. Estos medicamentos se han relacionado con un mayor riesgo de fractura. Los mecanismos pueden incluir alteración del transporte de minerales hacia los túbulos renales. Estudios *in vitro* aseguran que una exposición a largo plazo de los inhibidores de SGLT-2 ejercen efectos adversos en los compartimentos trabeculares del hueso. Además, si los pacientes diabéticos tienen un deterioro de la función renal, están en diálisis o se han beneficiado de un trasplante de órganos, la osteodistrofia renal y las terapias inmunosupresoras influyen negativamente en la calidad ósea (Epstein y cols., 2016). Otros factores incluyen el aumento de pérdida de calcio en la orina consecuencia de la hipertoncidad diabética (Wang y cols., 2016).

Tal y como se comentaba anteriormente, el recambio y la integridad del hueso se ven afectados por la osteoporosis y la diabetes mellitus. Cuando ambas condiciones patológicas se combinan, el recambio óseo se acelera y se produce una pérdida de hueso aditiva (Morgan y cols., 2018; Zheng y cols., 2018). En ratas diabéticas ovariectomizadas se observa aumento de la separación trabecular y de los biomarcadores de recambio óseo, al mismo tiempo que una disminución de la DMO, del volumen del hueso y del grosor de las corticales, lo que indica la validez del modelo animal (Zheng y cols., 2018). Como enfermedad sistémica crónica que afecta a los huesos, la diabetes mellitus produce un efecto sinérgico junto con la osteoporosis, aumentando el riesgo de fractura y retrasando la curación ósea (Wu y cols., 2019). Dicho en otras palabras, los pacientes diabéticos que sufren de osteoporosis son demandantes de los métodos de la ingeniería tisular ósea ante defectos en el hueso puesto que presentan el efecto negativo de ambas enfermedades sobre la fisiología ósea. Sin embargo, es necesario investigar con más profundidad cómo se comportarían las implantaciones de la ingeniería tisular ósea en estos pacientes (Morgan y cols., 2018; Wu y cols., 2019; Zheng y cols., 2018).

1.5. ELEMENTOS DE LA INGENIERÍA TISULAR ÓSEA

1.5.1. Matrices sintéticas tridimensionales

Las matrices son esenciales para lograr la curación y reparación *in vitro* e *in vivo* del tejido dañado y han demostrado tener un notable éxito en las aplicaciones de la ingeniería tisular (Eap y cols., 2015; Hashemibeni y cols., 2014; Bouler y cols., 2017). Estas matrices, realizadas a partir de diferentes biomateriales, proporcionan un compartimiento bioquímico y mecánico tridimensional que determina la estructura y función del nuevo tejido formado y son responsables de transmitir abundantes señales químicas y mecánicas que median la fisiología celular, tales como la adhesión, migración, proliferación y muerte celular para, posteriormente, originar el crecimiento de nuevo tejido óseo (Shang y cols., 2014; Yu y cols., 2017; Millan y cols., 2018). Además, ejercen una importante función en proporcionar un soporte mecánico que permita la máxima unión de las células madre mesenquimales, así como en permitir la diferenciación osteogénica *in vitro*, la deposición de la matriz ósea mineralizada después de su implantación *in vivo* y posibilitar el suministro de nutrientes y oxígeno a las células (Shang y cols., 2014; Cheng y cols., 2013; Hashemibeni y cols., 2014; Rameshwar y cols., 2015; Gadelkarim y cols., 2018). De este modo, esta matriz ideal para la regeneración tisular ósea ha sido diseñada para imitar la estructura y función biológica de un tejido óseo sano en términos tanto de composición química, estructura y propiedades biológicas (Eap y cols., 2015; Hongshi y cols., 2018). Así, con el fin de lograr con éxito la osteoinducción a través de la ingeniería tisular ósea para regenerar el hueso perdido, en las últimas cinco décadas se ha estudiado esta propiedad en un gran número de materiales (Eap y cols., 2015). A pesar de ello, el parámetro exacto y los mecanismos que gobiernan la formación ectópica de hueso aún no están completamente definidos. No obstante, se sugiere que los parámetros que se deben tener en cuenta a la hora de escoger el biomaterial con el que se elaborará la matriz son: i) la composición química y las propiedades de disolución del material, lo que crea un ambiente rico en iones de calcio y fosfato. ii) la geometría, esto es, el tamaño de los poros, la interconectividad y la porosidad que presenta el material, lo que favorece en distinto grado, por difusión pasiva, a la proliferación celular y el efectivo transporte de nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento y residuos del metabolismo celular, al igual que la proliferación y crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, así como el continuo crecimiento de tejido óseo desde la periferia al interior

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

de las matrices (Wang y cols., 2014; Gadelkarim y cols., 2018; Hongshi y cols., 2018; Wang y cols., 2017; Millan y cols., 2018). Por ejemplo, el estudio hecho por Deng y cols. en 2014 (Deng y cols., 2014) asegura que un mayor porcentaje de porosidad permite un mejor reclutamiento celular y una mejor vascularización lo que se traduce en una mejora en la osteogénesis. El tamaño del poro de las matrices puede dictar la estructura y el modo de formación del nuevo hueso, de modo que, un tamaño más grande del poro puede facilitar una mayor difusión de oxígeno y de nutrientes y favorecer el proceso de la angiogénesis durante la remodelación del hueso (Deng y cols., 2014). iii) la topografía de la superficie y los microporos que afectan a la diferenciación osteogénica de las células indiferenciadas, ya sea directamente (diferenciación mediada por adhesión) o indirectamente (a través de la adhesión y precipitación de proteínas endógenas y promoviendo la adhesión entre osteoblastos y superficie de la matriz y el intercambio de sustancias (Wang y cols., 2014; Cheng y cols., 2013; Hongshi y cols., 2018; Wang y cols., 2017). iv) la hidrofilia del material puesto que cuanto mayor sea la hidrofilia de los elementos que componen la matriz, más fácilmente se adherirán las células. Esta es una característica crucial porque gracias a una efectiva adhesión celular se puede permitir su migración, proliferación y diferenciación sobre la matriz y v) las especies y la genética de los modelos animales empleados para llevar a cabo la experimentación y el sitio de implantación del sustituto óseo (Wang y cols., 2014; Cheng y cols., 2013; Wang y cols., 2017) (Figura 4).

Así, estas matrices incluyen metales, polímeros reabsorbibles y no reabsorbibles, cerámicas inertes (aluminio, zirconio), cerámicas de vidrio especial descritas como cristales bioactivos: sulfato de calcio, carbonatos de calcio y fosfatos de calcio. Estos materiales inorgánicos difieren de la composición y las propiedades físicas entre sí y con respecto al hueso (Bouler y cols., 2017; Millan y cols., 2018). De entre todas ellas destacan las matrices biocerámicas (cerámicas de fosfato de calcio, cerámicas de silicato de calcio, cristales bioactivos) por su biocompatibilidad y similitud química con la fase mineral del hueso (Hongshi y cols., 2018; Millan y cols., 2018). Suponen un atractivo elemento para la regeneración tisular del hueso por su similitud con los componentes nativos óseos inorgánicos gracias sus características de biocompatibilidad, biodegradabilidad, hidrofiliada, bioactividad, porosidad, semipermeabilidad,

osteconductividad y osteoinducción (Gadelkarim y cols., 2018; Hongshi y cols., 2018; Millan y cols., 2018).

Sin embargo, estas matrices extracelulares inertes no generan de manera eficiente una reparación duradera del tejido óseo formado. Por tanto, existe una necesidad de investigar nuevos materiales que garanticen una liberación sostenida de compuestos activos favoreciendo la creación de un tejido óseo de calidad, es decir, un hueso con densidad, volumen trabecular y contenido en mineral que permita soportar las cargas a las que es sometida la zona del defecto óseo (Eap y cols., 2015).



Figura 4. Características de las matrices empleadas en la regeneración ósea

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

1.5.2. Células madre mesenquimales

Las células madre (CM) constituyen el tipo celular por excelencia que forma parte de la ingeniería tisular ósea por su capacidad de autorenovación y de diferenciación en múltiples estirpes celulares (Figura 5). Los científicos descubrieron que las células madre mesenquimales del adulto (CMM) son el único tipo celular que posee la función de reparar el tejido dañado o enfermo encontrándose en una amplia variedad de tejidos del organismo (Asatrian y cols., 2015; Moraldi y cols., 2018).

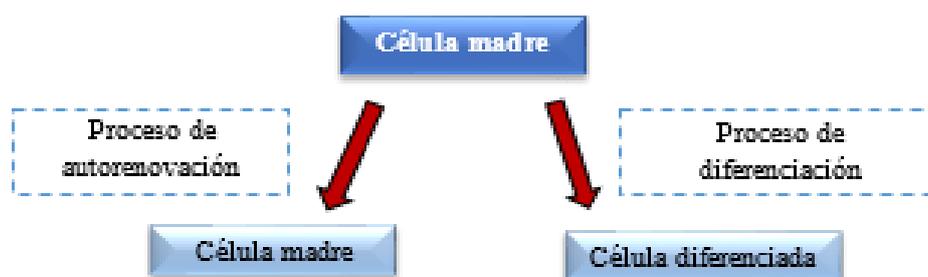


Figura 5. Características de las células madre mesenquimales

Estas células madre se encuentran en distintos tejidos del organismo, tales como la médula ósea, y en situaciones de estrés, como es el caso de las lesiones óseas, son reclutadas al sitio del defecto diferenciándose en diversos tipos celulares (osteoblastos, condrocitos, adipocitos, mioblastos, cardiomiocitos, hepatocitos, neuronas, astrocitos, células endoteliales, fibroblastos y células estromales) y contribuir, así, a la regeneración de los tejidos musculoesqueléticos como huesos, cartílagos, tejidos adiposos, músculos y tendones (Weira y Hockin, 2010; Wei1 y cols., 2014; Qiu y cols., 2014). No obstante, el uso de células madre embrionicas ha sido de gran interés debido a su capacidad pluripotente, esto es, su capacidad de diferenciación en cualquier tipo de célula que compone el cuerpo humano. Sin embargo, sus aplicaciones clínicas son bastante limitadas debido a cuestiones éticas y a las dificultades que supone el control de su diferenciación en un único linaje celular, que normalmente produce la formación de un teratoma (Liao y cols., 2014; Moraldi y cols., 2018). En 2006, el Comité de Células Madre Tisulares y Mesenquimales de la Sociedad Internacional de Terapia Celular publicó cuatro criterios mínimos para clasificar a una célula como célula madre mesenquimal. En primer lugar, las CMM tienen la capacidad de adherirse a superficies plásticas cuando se mantienen en

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

condiciones estándar de cultivo. En segundo lugar, deben ser células estromales multipotentes que puedan diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos. En tercer lugar, expresen los biomarcadores de superficie CD73, CD90 y CD105. Finalmente, no deben expresar los marcadores CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 α . Asimismo, dicho comité afirmó que la diferenciación en células neurogénicas o miogénicas no es una característica necesariamente requerida para clasificar una célula como CMM (Asatrian y cols., 2015; Moraldi y cols., 2018).

Tras el descubrimiento inicial de las células madre mesenquimales de la médula ósea (CMM-MO), se identificaron numerosas fuentes de CMM, incluyendo tejidos de origen fetal (cordón umbilical, sangre de cordón umbilical o de la placenta), así como diversos tejidos adultos (dermis, pulpa dental, periostio, vasos sanguíneos, médula ósea, membrana sinovial, endometrio y tejido adiposo, entre otros) (Asatrian y cols., 2015).

1.5.3. Células madre mesenquimales de la médula ósea (CMM-MO)

Las CMM-MO son células multipotentes que se originan a partir del estroma de la médula ósea y constituyen una atractiva fuente de precursores osteogénicos para la ingeniería tisular ósea (Cheng y cols., 2013; Hashemibeni y cols., 2014; Moraldi y cols., 2018). La mayoría de los estudios publicados sobre regeneración ósea han usado células madre mesenquimales de la médula ósea puesto que ha sido considerada la principal fuente de células madre mesenquimales por su elevada tasa de aislamiento, gran capacidad proliferativa y elevado potencial de diferenciación (Ortiz Moura Fideles y cols., 2019; Jin y cols., 2019). Esta capacidad ha permitido que las células madre mesenquimales de la médula ósea (CMM-MO) se consideren como una fuente ideal para las aplicaciones de la ingeniería tisular ósea (Shang y cols., 2014). Son las células madre adultas mejores conocidas y más caracterizadas. Fueron descritas por primera vez por Friedenstein y cols. (Friedenstein y cols., 1970), quienes afirmaban que estas células presentaban la característica de adherencia a la superficie plástica al ser aisladas de la médula ósea y manifestaban una apariencia similar a los fibroblastos cuando estaban en cultivo (Friedenstein y cols., 1970). A partir de entonces, se publicaron artículos sobre las aplicaciones de las CMM-MO en la ingeniería tisular ósea tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Liao y cols., 2014; Moraldi y cols., 2018).

Existen múltiples ventajas en utilizar CMM-MO para la regeneración ósea. Por una parte, estas células son capaces de diferenciarse en células osteogénicas. Por tanto, al poder ser estimuladas por los adecuados factores microambientales, son capaces de formar nuevo hueso en el sitio de su implantación. Por otra parte, las CMM-MO pueden mejorar la eficiencia de la formación de nuevo hueso mediante la secreción de factores de crecimiento como proteína morfogénica ósea-2 (BMP-2) o el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), los cuales constituyen un papel clave en la formación ósea (Cheng y cols., 2013). Además, los osteoblastos que derivan de las CMM-MO secretan una gran variedad de citoquinas, incluyendo la interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-7 y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) que mantienen y regulan las actividades biológicas de las células madre hematopoyéticas (Qiu y cols., 2014). A todo ello, se suman las ventajas de ser fácilmente accesibles, tener la capacidad de expansión y auto-renovación y poseer un mínimo riesgo de rechazo inmunológico y de tumorigenicidad. Por estas razones, las CMM-MO constituyen una excelente fuente celular para reparar defectos óseos maxilofaciales y ortopédicos (Song y cols., 2015; Weira y Hockin, 2010; Bornes y cols., 2014).

Sin embargo, las CMM-MO no están exentas de presentar ciertos inconvenientes a la hora de desarrollar un protocolo adecuado de terapia celular. Estas características desfavorables son, entre otras: i) el limitado número de células que se obtienen de los aspirados de médula ósea, siendo éste un procedimiento doloroso, ii) potenciales complicaciones derivadas de su adquisición y iii) la poca capacidad multipotente que presentan estas células después de sucesivos pasajes y en personas de edad. Estas propiedades adversas hacen necesario enfocar las investigaciones hacia la búsqueda de una mejor fuente celular alternativa para la ingeniería tisular ósea (Liao y cols., 2014; Moraldi y cols., 2018; Ortiz Moura Fideles y cols., 2019; Jin y cols., 2019; Osagle-Clouard y cols., 2019; Shanbhag y cols., 2019).

1.5.4. Aplicación de las CMM-MO frente al concentrado de médula ósea (CMO)

La médula ósea es el único órgano del cuerpo humano en el que coexisten dos tipos diferentes de células madre: las células madre derivadas de la médula ósea (CM-MO) y las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (CMM-MO). Las células madre de la médula ósea (células madre hematopoyéticas, células progenitoras endoteliales y células madre mesenquimales) constituyen aproximadamente el 2% del total de las poblaciones celulares de la médula ósea (Mariano y cols., 2015; Liao y cols., 2013).

Las células madre representan una prometedora herramienta para el futuro de la medicina regenerativa al ser capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular, órgano o tejido. Estas células madre pueden clasificarse, principalmente, en tres grupos: i) células madre embrionarias cuyo origen se encuentra en la capa más interna del blastocito, capaces de formar células de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo, endodermo), ii) células madre fetales, aquellas que se encuentran en el embrión y forman los distintos órganos del cuerpo humano; incluyendo las células de la cresta neural, las células hematopoyéticas y las células progenitoras pancreáticas y iii) las células madre adultas que se encuentran en varias regiones del organismo del adulto como en la médula ósea, la piel, los ojos, las vísceras y el cerebro. En términos de capacidad de proliferación, las células madre también se clasifican en células totipotentes, pluripotentes o multipotentes. Las células madre totipotentes presentan una alta capacidad para la diferenciación y pueden llegar a formar un individuo completo, pero carecen de la capacidad de auto-renovación. Por otra parte, las células pluripotentes son capaces de diferenciarse en cualquiera de los más de doscientos tipos de células que componen el cuerpo humano. Finalmente, son las células multipotentes las que dan lugar a las células de un tejido específico, por ejemplo, las células madre hematopoyéticas originan las células de la sangre, mientras que las células madre neuronales producen las neuronas y las células gliales. Otro grupo de células madre que se han estudiado ampliamente en los últimos años pero que no se encuentran de forma natural en el organismo, son las células madre pluripotentes inducidas que son capaces de regresar a su estado pluripotente mediante mecanismos derivados de la ingeniería genética (Fujimaki y cols., 2013; Rameshwar y cols., 2015).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

Las células madre que se encuentran en la médula ósea pueden ser recogidas y aisladas del resto de células contenidas en este órgano, según diversos autores, mediante dos métodos (Liao y Tse, 2013; Ohnishi y cols., 2014). Uno obtiene dichas células a partir de la aspiración de una porción de la médula ósea para luego someter el aspirado a una centrifugación por gradiente de densidad o, menos utilizado, mediante un separador celular, mientras que el otro procedimiento consiste en el aislamiento, cultivo y expansión de las CMM-MO (Ohnishi y cols., 2014).

1.5.4.1. CMO

El concentrado de células madre mesenquimales se obtiene mediante el aspirado de la médula ósea por medio de una punción, normalmente de la cresta ilíaca con una jeringa de pocos milímetros (mm) de diámetro (1,5 - 2mm) (Figura 6). Este instrumento se inserta a través de la cortical ósea hasta llegar a hueso esponjoso, donde se comienza el proceso de aspiración. Para prevenir la hemodilución durante el mismo, la dirección y la profundidad de la aguja se ha de variar cada 2 mililitros (ml) de aspirado. Dicho aspirado se inyecta en un recipiente estéril, al que se le añade una dilución de suero salino fisiológico y heparina a distintas concentraciones.

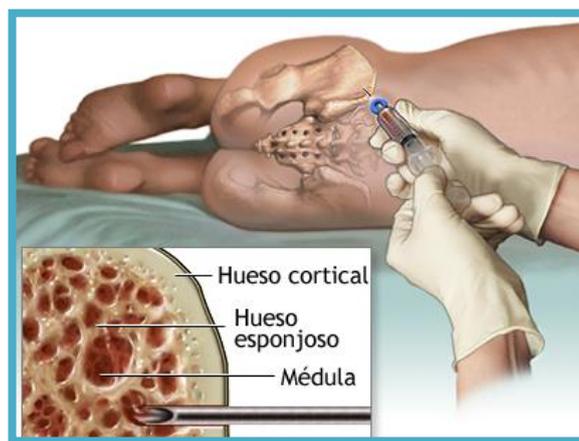


Figura 6. Aspirado de la médula ósea mediante punción. Tomada de Gersten y cols., 2020.

Una vez realizado lo anterior, el aspirado se somete a un centrifugado por gradiente de densidad durante un determinado tiempo y en un proceso automático se obtiene una separación del plasma y de las capas celulares, facilitando la obtención de la suspensión de las células mononucleadas. El extracto resultante de células madre, denominado “concentrado de médula ósea” es el que será trasplantado en la matriz elaborada a partir de distintos biomateriales en la zona del defecto óseo (Cuervas-Monsa y cols., 2013; Petri y cols., 2013). Se considera que por cada 60 ml de aspirado de médula ósea se obtienen alrededor de 10ml de concentrado medular, que contiene una media de 37×10^6 células mononucleadas de las cuales se obtienen 16×10^6 células CD34 positivas (células madre hematopoyéticas) y 3.000 unidades formadoras de colonias por mililitro (Cuervas-Monsa y cols., 2013). Este concentrado de médula ósea se utiliza, principalmente, en terapias para tratar tejidos isquémicos, fracturas y defectos óseos (Ohnishi y cols., 2014).

1.5.4.2. Aislamiento, expansión in vitro y diferenciación de las CMM-MO

La “*International Society for Cellular Therapy*” (ISCT) considera que el protocolo ideal de terapia celular para la regeneración ósea debe incluir el aislamiento, la expansión *in vitro* y la diferenciación de las células madre mesenquimales antes de su implantación en la matriz extracelular adecuada (Vulcano y cols., 2013; Ullah y cols., 2015). No obstante, existen distintos protocolos descritos en términos de aislamiento, caracterización y expansión de las células madre mesenquimales, pero todos ellos muestran los criterios mínimos descrito por dicho organismo. Estos diversos protocolos para conseguir el aislamiento de las células madre se basan en la capacidad de estas células de adherirse a una superficie plástica (placas de cultivo). El establecimiento de un procedimiento comprensivo para el aislamiento, el cultivo y la expansión de las CMM-MO es la clave para el éxito del uso de estas células como una adecuada fuente para la medicina regenerativa. Las células madre derivadas de la médula ósea, de la sangre periférica y del fluido sinovial se aíslan mediante distintos métodos de gradiente de densidad y se cultivan en placas de cultivo (Figura 7). Cuando se realiza el aislamiento de las CMM-MO, algunas células hematopoyéticas se adhieren a la placa de cultivo pero durante el subcultivo estas células se eliminan mediante lavado, dejando únicamente las células adherentes similares a los fibroblastos, es decir, las células madre mesenquimales. Las CMM-MO se cultivan, posteriormente, en un “medio condicionado” como el medio

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM). Este medio de cultivo primario se suplementa con un 10% de suero fetal bovino (SFB), suero de ternero recién nacido o suero de ternero fetal. Asimismo, se debe tener en cuenta que, además del medio de cultivo y del suplemento, la concentración de oxígeno también afecta a la expansión y proliferación de las CMM-MO (Ullah y cols., 2015). Posteriormente, se someten a estas células a un proceso llamado “expansión” que consiste en la estimulación del crecimiento de estas poblaciones celulares ya que se considera que existe 1 célula madre mesenquimal por cada 10.000-100.000 células que se albergan en la médula ósea mientras que suponen sólo el 0,01% de la fracción de células madre allí existente (Mariano y cols., 2015; Liao y Tse, 2013). En la expansión de las CMM-MO se puede emplear DMEM con bajo contenido en glucosa suplementado con factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento epidermal, entre otros. Pese a todas estas opciones, lo que más comúnmente se aplica en el cultivo y la expansión *in vitro* de las CMM-MO es DMEM con 10% de SFB (Ullah y cols., 2015).

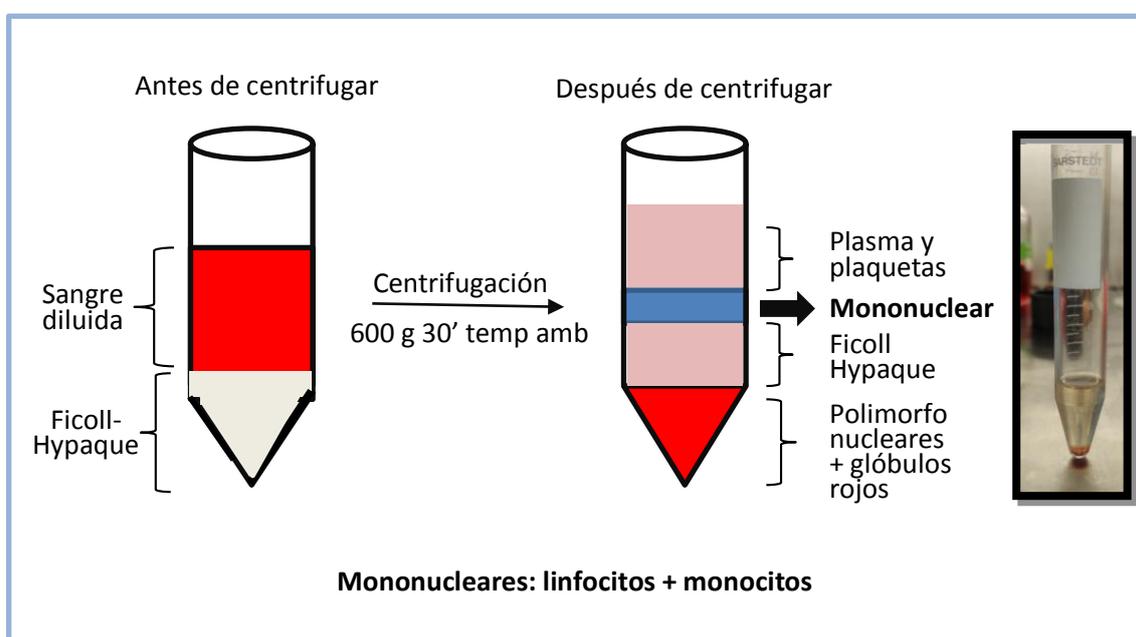


Figura 7. Obtención de células mononucleares mediante gradiente de densidad.

1.5.4.3. Desventajas del aislamiento, la expansión *in vitro* y la diferenciación de las CMM-MO

La expansión *in vitro* de las células madre mesenquimales indiferenciadas es un método que requiere ciertas consideraciones particulares, tales como la necesidad de mantener la esterilidad del cultivo celular y por tanto, el riesgo de contaminación microbiana, el uso de suero fetal bovino, cuyo uso se encuentra actualmente en debate, al igual que otros componentes no autólogos que se utilizan durante este procedimiento y el desarrollo del proceso de expansión del cultivo que se traduce en una mayor inversión del tiempo requerido. Además del alto coste económico y de su elevada dificultad (Betsch y cols., 2013; Kim y cols., 2015). Otra característica a tener en cuenta en esta técnica es la senescencia celular relacionada con el tiempo de expansión *in vitro*. Igualmente, se debe considerar la senescencia de los organismos adultos debido a que la función, la potencia y la replicación celular disminuye con el tiempo (Mariano y cols., 2015). Por estos motivos, ciertos autores consideran que una posible alternativa podría ser el uso del concentrado de médula ósea en el sitio del defecto óseo, para regenerar el hueso con el objetivo de rellenar los defectos óseos, estimular la curación de fracturas óseas y tratar las pseudoartrosis (Ohnishi y cols., 2014; Yang y cols., 2014). El primer resultado clínico prometedor para el tratamiento de defectos óseos con el concentrado medular fue obtenido por Hendrich y cols. en 2009 (Hendrich y cols., 2009) y Jager y cols. en 2009 (Jager y cols., 2009) enfatizando la seguridad de la extracción intraoperatoria y la inducción de la diferenciación osteogénica sin la aplicación de estímulos externos (Petri y cols., 2013). Estudios posteriores, tales como los realizados por Cuervas-Monsa y cols. en 2013 (Cuervas-Monsa y cols., 2013), Betsch y cols. en 2013 (Betsch y cols., 2013) u Ohnishi y cols. en 2014 (Ohnishi y cols., 2014) afirman que el concentrado de médula ósea posee un elevado potencial para producir la curación de los defectos óseos y cartilagosos debido a que contienen células madre y múltiples factores de crecimiento.

1.5.4.4. Ventajas del CMO

Las ventajas que presenta el concentrado de médula ósea frente a la expansión *in vitro* de las células madre mesenquimales es que al ser un procedimiento de un solo paso, el aislamiento de las células madre supone un método rápido, fácil y de bajo coste económico que proporciona una suspensión de células mononucleares ricas en células

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

madre mesenquimales, que rápidamente se adhiere a la superficie microporosa de una matriz previamente elaborada (Vulcano y cols., 2013; Torres y cols., 2015). Asimismo, elimina, sobre todo, el riesgo de infecciones atribuible a los complejos métodos requeridos para la expansión celular. Otra característica importante de esta técnica es la elevada concentración de plaquetas puesto que éstas liberan gránulos que contienen factores de crecimiento tisular, citoquinas y quimioquinas, lo que favorece la formación de hueso (Vulcano y cols., 2013).

Todas estas peculiaridades hacen que muchos estudios sugieran que la asociación del concentrado de médula ósea junto a una apropiada matriz sea un enfoque prometedor para el tratamiento de diversas situaciones clínicas, como las fracturas, las lesiones por tumores, las osteotomías y las cirugías de reemplazo articular, entre otras (Torres y cols., 2015).

1.5.4.5. Desventajas del CMO

Es necesario tener en cuenta que el primer método descrito, es decir, el concentrado de médula ósea, obtiene en su conjunto, células madre, sin incluir ninguna técnica para conseguir diferenciarlas en sus tres clases distintas (totipotentes, pluripotentes y multipotentes); mientras que, la segunda técnica, propuesta por la ISCT, tiene como objetivo el aislamiento de las células madre mesenquimales de la médula ósea. Las CMM-MO son un subconjunto de células madre que se encuentran en el estroma de la médula ósea, así como en otras fuentes celulares, tales como el tejido adiposo, el cordón umbilical y la placenta. Son positivas para los marcadores de superficie CD44, CD54 Y CD105, pero negativos para los marcadores de las células madre hematopoyéticas, CD34 y CD133. Estudios *in vitro* han demostrado que estas células madre multipotentes son capaces de diferenciarse en varios tipos celulares, incluyendo osteocitos, adipocitos, condrocitos, neuronas, hepatocitos y cardiomiocitos bajo adecuadas condiciones de cultivo (Liao y Tse, 2013; Ekizer y cols., 2014). De manera que, se puede controlar el tipo celular en el que se diferenciarán las CMM-MO cuando se estimulan con las apropiadas señales bioquímicas y así, determinar el tipo de tejido que se regenerará en el sitio del defecto óseo (Kim y cols., 2015; Ekizer y cols., 2014). Esta característica es primordial para diferenciarlas de los otros dos tipos de células madre que se encuentran en la médula ósea, esto es, de las células madre totipotentes y pluripotentes, a las cuales

no se les puede inducir su diferenciación (Kim y cols., 2015). Otras particularidades que hacen de las CMM-MO las células consideradas la mejor línea celular para conseguir los objetivos de la ingeniería tisular ósea son el bajo riesgo de provocar respuesta inmunológica por parte del huésped debido al bajo nivel de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II y porque pueden inhibir la proliferación y función de las células inmunes (linfocitos B, T, células NK y células dendríticas). Además de su estable fenotipo celular, su alta supervivencia y el bajo riesgo de desarrollar tumores (Liao y Tse, 2013; Ullah y cols., 2015; Kim y cols., 2015) sin olvidar el importante papel que desarrolla en la proliferación y migración de nuevas células al sitio de la lesión. Sin embargo, estas células no están exentas de presentar una serie de inconvenientes para lograr la regeneración ósea, tales como, el deterioro de su función con el transcurso del tiempo, el limitado potencial proliferativo y su baja disponibilidad y eficacia. En definitiva, todas las características comentadas anteriormente hacen de las CMM-MO las células estándar para conseguir la regeneración ósea en comparación con otros tipos de células madre (Mariano y cols., 2015; Liao y Tse, 2013). Si bien, las aplicaciones terapéuticas que se logran con estas células multipotentes son potencialmente aceptables, se requiere una definición más específica de lo que son las células madre como tal, puesto que hoy en día no existen marcadores específicos fiables que puedan discriminar entre las células madre mesenquimales y otros tipos celulares (Fujimaki y cols., 2013).

1.5.5. Células madre mesenquimales del tejido adiposo (CMM-A)

Uno de los principales objetivos de la ingeniería tisular es encontrar una fuente que pueda proporcionar un adecuado número de células madre para las aplicaciones clínicas que impliquen una mínima morbilidad. El tejido adiposo supone una gran promesa en la medicina regenerativa; dicho en otras palabras, está disponible en grandes cantidades como material de desecho y contiene un mayor número de células progenitoras que dan lugar a distintas poblaciones celulares si se relaciona con la médula ósea (Farré-Guasch y cols., 2010).

Las células madre derivadas del tejido adiposo (CMM-A) fueron descubiertas por primera vez en 2002 por Zuk y cols. (Zuk y cols., 2002), y, a partir de entonces, el tejido adiposo ha sido estudiado como una fuente de células madres para el desarrollo de la medicina regenerativa y la ingeniería tisular ósea, en particular, para la formación de

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

hueso (Weil y cols., 2014; Zuk y cols., 2002; Ortiz Moura Fideles y cols., 2019; Osagle-Clouard y cols., 2019; Jin y cols., 2019). Existen múltiples términos para las CMM-A, por ejemplo, preadipocitos, células estromales derivadas del tejido adiposo o células madre adultas derivadas de tejido adiposo. En 2004, se logró llegar a un consenso para denominarlas, finalmente, células madre adiposas (Tsuji y cols., 2014).

La localización de las CMM-A en el tejido adiposo aún no está totalmente esclarecido, pero el análisis histológico sugirió que el nicho de estas células se encuentra en la zona perivascular del tejido adiposo. Así, Traktuev y cols. (Traktuev y cols., 2008) concluyeron que la ubicación de las CMM-A se encuentra en la interfase entre el endotelio y los adipocitos y que, de esta manera, las CMM-A tienen la capacidad de servir de apoyo a la estructura vascular del tejido en el que se alberguen (Zuk y cols., 2002; Traktuev y cols., 2008).

En efecto, estas células son aisladas del tejido adiposo después de un procedimiento de liposucción. El tejido lipoaspirado es digerido primero con colagenasas, seguido de un proceso de centrifugación con el fin de obtener una capa celular en la parte más inferior del fondo del tubo de ensayo. El sedimento celular es la llamada fracción vascular estromal (FVE). En realidad, la FVE es una población heterogénea de células roja de la sangre, fibroblastos, células endoteliales, células musculares lisas, pericitos y células madre estromales/mesenquimales derivadas del tejido adiposo que tienen la capacidad de adherirse a superficies plásticas (Asatrian y cols., 2015; Liao y cols., 2014). Después de cultivar la FVE *in vitro* durante un cierto tiempo, la población celular se vuelve homogénea a las CMM-A. Cabe destacar que, aproximadamente, de 2 a 6 millones de células de la FVE pueden ser obtenidas en un mililitro de lipoaspirado (Zuk y cols., 2002; Liao y cols., 2014).

Las CMM-A también tienen la capacidad de diferenciación multipotente, al igual que las CMM-MO. Asimismo, el tejido adiposo se encuentra disponible en grandes cantidades y es bastante accesible (Asatrian y cols., 2015; Weil y cols., 2014). Igualmente, el proceso de liposucción es simple, fácil, puede ser repetido, no requiere el uso de anestesia general y produce un malestar mínimo al paciente; además de presentar menos complicaciones. El número de células madre que se obtienen a partir del tejido adiposo es mayor que el conseguido en la aspiración de médula ósea, lo que podría eliminar el

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

paso de expansión celular (Liao y cols., 2014; Mariano y cols., 2015). También, pueden ser sometidas a diferenciación osteogénica cuando son tratadas con ácido ascórbico, con vitamina D3 y con la proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2) o con β -glicerofosfato. Por otra parte, las CMM-A son capaces de diferenciarse en múltiples tipos celulares de tejidos mesenquimales tales como, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miocitos, cardiomiocitos y células endoteliales y existe una creciente evidencia que sugiere que estas células pueden también dar lugar a células de otros linajes, como el ectodermo y el endodermo. Además, el tejido adiposo secreta una gran variedad de factores de crecimiento antiapoptóticos y angiogénicos que hacen de la grasa una prometedora fuente para la cirugía reconstructiva (Weil y cols., 2014; Farré-Guasch y cols., 2010; Ortiz Moura Fideles y cols., 2019). Entre las múltiples ventajas que presenta el tejido adiposo como fuente de células madre destacan i) la alta disponibilidad por encontrarse en grandes cantidades, ii) la facilidad en la obtención por lipoaspirado o biopsia del tejido adiposo lo que se traduce en una limitada morbilidad, iii) el rendimiento celular es mucho mayor que el encontrado en otras fuentes, iv) las células son fácilmente aisladas del resto de componentes celulares que forman el tejido y v) el procedimiento de expansión *in vitro* es sencillo por lo que presenta mayor tasa de proliferación que las CMM-MO (Ortiz Moura Fideles y cols., 2019; Osagle-Clouard y cols., 2019; Torres-Torrillas y cols., 2019; Jin y cols., 2019). En lo referente al rendimiento celular sí que existe una diferencia significativa: por 1mL de aspirado medular existen 6×10^6 células nucleadas consideradas como CMM-MO, lo que supone un 0.01% de CMM-MO, mientras que en 1G de tejido adiposo, el 10% de las células encontradas son células madre (Shanbhag y cols., 2019; Osagle-Clouard y cols., 2019). Además, las CMM-A presentan menor riesgo de rechazo y son más estables genéticamente en cultivo de largo plazo y tienen una tasa de senescencia más baja que las CMM-MO (Torres-Torrilla y cols., 2019; Ortiz Moura Fideles y cols., 2019). Previenen la proliferación y función de muchas células inmunes inflamatorias como las células asesinas naturales (NK), las células B, T, monocitos, macrófagos y células dendríticas (Torres-Torrilla y cols., 2019). Por otra parte, según el estudio publicado por Ortiz Moura Fideles y colaboradores en 2019 (Ortiz Moura Fideles y cols., 2019), las CMM-A presentan mayores características que le confieren un mayor potencial angiogénico mientras que las CMM-MO tienen mayor capacidad de diferenciación osteoblástica y osteogénica puesto que mantienen un recuerdo de su tejido de origen (Ortiz Moura Fideles y cols., 2019). Igualmente, secretan el factor de

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

crecimiento endotelial vascular y proteínas antiinflamatorias ante moléculas inflamatorias desarrollando un importante papel en la angiogénesis y en la reparación ósea (Jin y cols., 2019; Torres-Torrilla y cols., 2019).

Por tanto, las CMM-A han sido sugeridas como la fuente celular que obtiene los mejores resultados en la regeneración ósea mediante ingeniería tisular superando las óptimas cualidades de las CMM-MO. Al respecto, numerosas investigaciones demostraron el potencial osteogénico de las CMM-A tanto *in vivo* como *in vitro* (Weil y cols., 2014; Osagle-Clouard y cols., 2019; Ortiz Moura Fideles y cols., 2019).

Por consiguiente, estudios en modelos animales pequeños, las CMM-A han demostrado tener numerosas propiedades para obtener una óptima regeneración ósea. Entre estas propiedades se encuentran la capacidad para reparar defectos de calota de tamaño crítico, para estimular la formación ósea en defectos apendiculares y para inducir la fusión espinal en modelos de ratas. Del mismo modo, en un modelo animal grande en perros, se observó que las CMM-A implantadas promovían la formación ósea en reparaciones craneofaciales. Una gran variedad de matrices ha sido utilizada en la reparación ósea mediada por CMM-A, como matrices de coral, matrices colágenas tipo I o matrices de colágeno portador de cerámica, entre otras. Por lo tanto, las CMM-A poseen una eficacia significativa y un potencial osteogénico consistente para ser utilizadas en la ingeniería tisular ósea (Weil y cols., 2014; Ortiz Moura Fideles y cols., 2019; Osagle-Clouard y cols., 2019; Torres-Torrillas y cols., 2019; Jin y cols., 2019).

No obstante, el cultivo *in vitro* ha demostrado que su capacidad de auto-renovación y su multipotencia disminuyen con los sucesivos pases celulares y, en algunos casos, ha dado lugar a la inestabilidad genómica (preocupación trascendental por la posible transformación maligna espontánea). Además, la capacidad proliferativa de las CMM-A también se correlaciona de manera inversamente proporcional con la edad del paciente (consideración a destacar en las aplicaciones clínicas que implican pacientes geriátricos y osteoporóticos) (Weil y cols., 2014). Por otra parte, las propiedades inmunosupresoras de estas células sugieren que las CMM-A autólogas o alogénicas se puedan utilizar con éxito en la reparación de tejidos sin llegar a provocar una reacción linfocitaria. Sin embargo, se deben hacer investigaciones adicionales para analizar si esta reacción inmune puede ser desencadenada cuando se produce la diferenciación de las

CMM-A. Sin embargo, este doble potencial mitogénico/inmunomodulador de las CMM-A puede ser perjudicial debido a que puede estimular la proliferación de células cancerosas mientras que al mismo tiempo disminuye la proliferación de células T que podrían formar intervenir en el desarrollo de la respuesta antineoplásica. Además, los mecanismos por el que las CMM-A secretan CXCL12 y FGFR2 han demostrado aumentar la migración de células tumorales y la angiogénesis, respectivamente. De este modo, las CMM-A no debería ser la mejor opción para la reconstrucción ósea después de la resección del tumor (Weil y cols., 2014).

Una importante característica de las CMM-A es que no constituyen una población homogénea. Muchos estudios han intentado caracterizar a las CMM-A utilizando marcadores de superficie celular mediante análisis de citometría de flujo, aunque todavía no se ha identificado un único marcador. Las CMM-A tienen una expresión positiva de CD34 en el cultivo primario, pero la expresión de este marcador disminuye conforme se van realizando los sucesivos pasajes. Las CMM-A expresan marcadores mesenquimales típicos tales como CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90 y CD105, así como son negativos para los antígenos hematopoyéticos, entre los que se encuentran CD14, CD31, CD45 y CD144. Igualmente, después del cultivo y los pasajes, los marcadores de superficie de las CMM-A pueden cambiar. Así, la expresión de marcadores hematopoyéticos tales como CD11, CD14, CD34, CD45 se disipa o bien, se pierde. Por otra parte, el nivel de la expresión de CD29, CD73, CD90 y CD166 aumenta desde el FVE hasta el segundo pase celular (Zuk y cols., 2002).

En otras palabras, aunque las CMM-A son consideradas como una estimable oportunidad para reemplazar la función de las CMM-MO en la ingeniería tisular ósea debido a la elevada celularidad que presentan en el tejido adiposo, la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes celulares y de secretar diversas citoquinas; además de sus efectos inmunomoduladores comentados anteriormente. Todo ello hace de las CMM-A una prometedora fuente de células que pueden ser aplicadas en la medicina regenerativa. No obstante, es indispensable cuestionarse si la capacidad osteogénica de las CMM-A es la misma o superior a la de las CMM-MO (Osagle-Clouard y cols., 2019; Ortiz Moura Fideles y cols., 2019). Esta cuestión sigue siendo de controversia puesto que la mayoría de los artículos describen el potencial osteogénico o la capacidad de regeneración ósea sólo para las CMM-MO o sólo para las CMM-A, sin llegar a hacer una

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

comparación en profundidad. Una gran cantidad de variaciones en los métodos de cultivo y analíticos, en la selección de la matriz adecuada y en los modelos animales requeridos dan lugar a dificultades para hacer una conclusión fehaciente para demostrar cuál es la mejor fuente de células madres para la ingeniería tisular mediante la comparación de sus funciones. Por tanto, esto hace necesario un mayor número de investigaciones para garantizar la seguridad de las CMM-A y la eficacia de la ingeniería tisular en defectos óseos críticos utilizando este tipo de células (Asatrian y cols., 2015; Zuk y cols., 2002).

En lo que nos respecta, la cavidad oral contiene una masa de tejido adiposo especializado, la bola de grasa bucal o bola adiposa de Bichat (BAB), que es distinta de la grasa subcutánea. La fácil accesibilidad y la rica vascularización hacen de esta masa grasa un atractivo injerto, que ha sido ampliamente utilizada en la cirugía oral para reparar los defectos óseos y periodontales. La extracción de la BAB es un procedimiento simple que requiere una incisión mínima con previa anestesia local y causa una mínima morbilidad en el sitio donante. Además, actualmente se ha demostrado que las CMM de la bola adiposa de Bichat expresan marcadores característicos de las CMM y pueden diferenciarse en condrocitos, osteoblastos y adipocitos, al igual que las CMM-A (Farré-Guasch y cols., 2010; Zuk y cols., 2002).

A diferencia del tejido subcutáneo, la bola adiposa de Bichat es una masa especializada de tejido adiposo considerado un colgajo ideal para la cirugía oral; ya que es fácil de recoger y una fuente fiable, además de contener un rico aporte sanguíneo, y su recolección causa una mínima morbilidad en el sitio donante y una baja complicación. El tamaño de la bola adiposa de Bichat parece ser similar entre diferentes personas e independiente de su peso corporal y de la distribución de la grasa. Los pacientes con poca grasa subcutánea tienen una BAB con un normal peso y volumen (Farré-Guasch y cols., 2010; Zuk y cols., 2002).

El estudio realizado por Farré-Guasch y cols. en 2010 (Farré-Guasch y cols., 2010) demostraron que la BAB contiene una elevada proporción de células con características de las CMM-A que pueden ser fácilmente aisladas y expandidas *in vitro* (Farré-Guasch y cols., 2010). Aproximadamente el 30% de la fracción del estroma vascular de la BAB expresa marcadores de superficie característicos de las CMM-A, que son CD90, CD73, CD29 y CD34 (Mariano y cols., 2015; Zuk y cols., 2002). El porcentaje

de las CMM-A a partir de la BAB obtenido en este estudio es ligeramente superior que el obtenido del tejido adiposo subcutáneo. Además, la presencia de CMM en la médula ósea es, tal y como se citaba anteriormente, menor del 0'01%, esto hace que la BAB sea una excelente fuente de CMM-A, eliminando la necesidad de una expansión *in vitro*, los altos costes y el riesgo de contaminación. La expresión de CD34 es característico de las CMM-A y su expresión disminuye con los pases celulares que se realizan en las CMM-A. Dicha expresión en estas células contrasta con la de las CMM-MO, que carecen de la expresión de este marcador. Las células CD34 son capaces de estimular la angiogénesis y están envueltos en el proceso de neovascularización que facilita la curación de los tejidos isquémicos. La expansión *in vitro* de las células de la fracción del estroma vascular causa cambio en el fenotipo y en las características de estas células como la pérdida de la expresión de CD34. La hipótesis de este estudio es que la expresión de CD34 puede estar relacionada con las diferencias en las propiedades celulares y el potencial de diferenciación. Las CMM-A aisladas de la BAB carecen de la expresión de CD105, pero la expresión de este marcador aumenta rápidamente después del cultivo, como se ha descrito por otros autores que usan CMM-A a partir de otros depósitos de grasa. Las CMM-A también muestran una falta de la expresión de CD146, un marcador característico de las células endoteliales como las células del músculo liso vascular (Farré-Guasch y cols., 2010).

Por otra parte, se esperaba que las diferencias en el sitio de origen del tejido adiposo se relacionasen con las diferentes proporciones de tipos celulares como las células progenitoras epiteliales, fibroblastos, pericitos, mioblastos y similares. De este modo, al evaluar las diferencias entre el tejido adiposo subcutáneo y la bola adiposa de Bichat se observó diferencias en la expresión del marcador CD34 en ambos tejidos. La diferencia puede ser atribuida al elevado suministro de sangre del tejido visceral, lo que puede contribuir a la heterogenicidad de la población celular, que puede traducirse en un aumento del potencial osteogénico. Se encontraron una mayor expresión en los pasajes de las CMM-A derivadas de la BAB que los comparados con las CMM-A del tejido adiposo subcutáneo, lo que podría hacer de la BAB la fuente más adecuada para el uso de las terapias de la ingeniería tisular. La fuente ideal de las células madre para la ingeniería tisular podría ser aquella que pueda ser fácilmente recogida, y que contenga un alto número de células madre expansibles. Por tanto, la investigación realizada por Farré-

Guasch y cols. en 2010 demuestra que bajo las apropiadas condiciones las CMM-A de la BAB pueden diferenciarse en condrocitos, osteoblastos o adipocitos, sugiriendo que la BAB puede ser una fuente alternativa rica en células madre, fácilmente disponible para las aplicaciones clínicas en el campo de la ingeniería tisular para reparar los defectos óseos (Farré-Guasch y cols., 2010; Moraldi y cols., 2018).

1.6. MATERIALES EMPLEADOS EN LA REGENERACIÓN ÓSEA

1.6.1. Cerámicas bifásicas: hidroxiapatita y β -fosfato tricálcico

La reparación ósea es una compleja cascada de procesos biológicos controlados por numerosas citoquinas y factores de crecimiento que proporcionan señales al sitio local de la lesión, permitiendo a las células madre y a las células inflamatorias migrar y desencadenar el proceso de curación. De este modo, es indispensable el desarrollo de implantaciones que sirvan simultáneamente como una matriz osteoconductiva y como un recurso para la liberación de los factores de crecimiento necesaria para la óptima regeneración del hueso en algunas aplicaciones clínicas; además de proporcionar un entorno en tres dimensiones y un soporte mecánico para las células (Liao y cols., 2014; Garai y Sinha, 2014; Wubneh y cols., 2018).

Por consiguiente, es esencial para la ingeniería tisular la creación de un apropiado material que constituya estas matrices, por el hecho de regular el comportamiento de las células, como la proliferación y diferenciación celular, tanto en las rutas osteogénicas como en las condrogénicas (Yang y cols., 2014; Wubneh y cols., 2018). Se ha investigado la osteoconducción de un gran número de materiales sintéticos, también llamados biomateriales, para la reconstrucción de defectos óseos (Garai y Sinha, 2014; Wang y cols., 2014). Sin embargo, los parámetros exactos que influyen y el mecanismo que gobierna en la formación de hueso ectópico aún no se han dilucidado completamente. Se ha sugerido que los principales parámetros para conseguir una osteoinducción exitosa son: i) la composición química de los materiales y las propiedades de disolución relacionadas, que crean un ambiente rico en iones de calcio y de fosfato, ii) la geometría (porosidad, interconectividad y tamaño del poro) que ayuda al aporte de nutrientes y de oxígeno y al reclutamiento de las células madre, iii) la topografía de la superficie y los microporos, que determinan el área superficial específica y afecta a la diferenciación osteogénica de las células indiferenciadas tanto directamente (diferenciación mediada por *Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis*

la adhesión) o indirectamente (vía absorción/ precipitación de las proteínas endógenas relevantes), iv) la especie y la genética de los modelos animales y v) el sitio de implantación (Wang y cols., 2014; Wubneh y cols., 2018). Se considera fundamental que todas estas propiedades estén presentes en los biomateriales puesto que deben desempeñar varias funciones en la regeneración ósea, entre las que se encuentran la resistencia mecánica, la biodegradabilidad y la capacidad de soporte y de inducir la diferenciación de las células regenerativas. Hasta la fecha, ningún biomaterial cumple con todos estos criterios. No obstante, combinando ciertos biomateriales que contengan características específicas puede eludir alguna de sus limitaciones. Por tanto, varios estudios se han centrado en desarrollar y caracterizar biomateriales bioactivos y biodegradables. Estos materiales compuestos están diseñados para imitar los componentes que forman el hueso, para eliminar las respuestas celulares específicas y para proporcionar un ambiente ideal para la formación de hueso (Wang y cols., 2014; Eldesoq y cols., 2014; Wubneh y cols., 2018).

De este modo, la hidroxiapatita (HA) y el fosfato de calcio (CaP) han sido utilizados satisfactoriamente como materiales de injertos óseos para la regeneración de los defectos del hueso debido a sus propiedades físicas y químicas, y su similitud estructural al hueso natural. Los materiales basados en fosfato de calcio han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para las aplicaciones clínicas en el campo de la cirugía dental y ortopédica (Yang y cols., 2014; Song y cols., 2014; Yu y cols., 2017; Ghamor-Amegavi y cols., 2019).

1.6.1.1. El β -fosfato tricálcico

El fosfato tricálcico es otra clase de materiales de injerto óseo que ha demostrado ser parcialmente biorreabsorbido cuando se implanta. Este material tiene una composición química $[\text{Ca}^3 (\text{PO}_4)^2]$ con una relación de calcio/fosfato de 1'5 y es mineralógicamente beta-whitlockita. Los diversos tipos de fosfatos tricálcicos (TCP) pueden presentarse en 4 formas cristalinas: β -TCP, α -TCP, α' -TCP y γ -TCP. Cabe destacar que β -TCP supera a sus análogas en sus características biológicas; sus propiedades de biocompatibilidad, osteoconductividad, estabilidad estructural y equilibrio favorable entre absorción y degradación son muy favorables para la regeneración tisular (Jain y cols., 2014; Wang y cols., 2017; Valentim y cols., 2018;

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

Bouler y cols., 2018). Por tanto, es ampliamente utilizado en la clínica como sustituto del injerto óseo (Jain y cols., 2014; Gallinetti y cols., 2014). Es un material que presenta una alta osteoconductividad aunque se reabsorbe fácilmente en los fluidos corporales y en otras soluciones (Yang y cols., 2014; Lee y cols., 2013; Wang y cols., 2017; Millan y cols., 2018). Esta característica supone tanto una ventaja como un inconveniente en la regeneración de hueso. Por una parte, implica un bajo riesgo para ser identificado por el organismo como un material extraño ya que no permanece por mucho tiempo en el mismo y desarrollar así una reacción inmunológica, con las consecuencias tan desfavorables que esto supone para lograr la formación de un hueso de calidad y que, por tanto, pueda limitar su uso en zonas anatómicas de poca carga mecánica (Lee y cols., 2013; Millan y cols., 2018). Sin embargo, por otra parte, la tasa de curación ósea disminuye drásticamente si la reabsorción del material ocurre antes que la formación de nuevo hueso. En consecuencia, el β -TCP no puede proporcionar un marco estable para el crecimiento del tejido óseo. De este modo, para complementar la limitación, los materiales compuestos de β -TCP con una alta reabsorción e HA con una buena osteoconductividad han sido examinados *in vitro* e *in vivo* para estudiar su utilidad en el proceso de reparación ósea (Lee y cols., 2013).

1.6.1.2. La hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HA) $[\text{Ca}^{10} (\text{PO}_4)^6 (\text{OH})^2]$ es un material inorgánico de origen natural que forma parte del tejido mineralizado de los huesos y del esmalte de los dientes en los seres humanos y en los vertebrados (Jain y cols., 2014; Khajuria y cols., 2015). Se utiliza para sustituir al hueso debido a su similar composición química en relación a la fase inorgánica del hueso, en lo que se refiere a la composición, tamaño y estructura morfológica y tienen una relación calcio-fosfato de 1'67 (Jain y cols., 2014; Liao y cols., 2014). Además, este componente inorgánico principal del hueso, presenta propiedades bioactivas, biodegradables y osteoconductoras. También se sabe de sus características de biocompatibilidad, no toxicidad, y de ausencia de respuesta inflamatoria e inmunogénica cuando se implantan dentro del tejido conectivo y de los tejidos óseos, y es capaz de formar un enlace químico directo con los tejidos óseos adyacentes, de manera que la deposición de cristales minerales de hueso puede ocurrir directamente sobre la superficie de las partículas de apatita implantadas (Jafarian y cols., 2008; Pinheiro y cols., 2014). Por todo ello, es una de las opciones más comúnmente utilizada en las aplicaciones de la *Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis*

regeneración ósea y en los implantes biomédicos (Garai y Sinha, 2014; Song y cols., 2014, Liao y cols., 2014).

Los biomateriales de HA se encuentran disponibles en varias formas como cementos de HA, HA no porosas, HA porosas, HA de tamaño nanométrico y como biocerámicas presentando en esta última una estructura más densa (Jain y cols., 2014). La hidroxiapatita sintética ha sido preparada usando una variedad de métodos, como la precipitación a partir de una solución, de deposición hidrotermal, hidrolisis, síntesis mecano-química y técnicas de sol-gel. Comúnmente, los implantes de HA sintética se obtienen mediante la preparación de partículas de HA de tamaño nano o micrométrico y luego, proporcionándole la morfología o arquitectura deseada (Garai y Sinha, 2014). La hidroxiapatita en forma de matrices porosas, sustratos o gránulos ha sido ampliamente investigado para el uso de las aplicaciones biomédicas, así como para la cirugía maxilofacial, periodontal y oral y para las reconstrucciones esqueléticas, demostrado que la adición de HA a las matrices óseas es capaz de mejorar la osteoconductividad y biocompatibilidad de las mismas (Garai y Sinha, 2014; Liao y cols., 2014).

Sin embargo, existen ciertas limitaciones debido a su fragilidad inherente, su baja solubilidad *in vivo*, persistiendo muchas partículas residuales y a sus pobres propiedades mecánicas para ser utilizado como material de reemplazo durante la reparación de un hueso que soporta cargas (Garai y Sinha, 2014; Yang y cols., 2014; Liao y cols., 2014). Con el objetivo de paliar su no biorreabsorción, se ha recurrido al uso de biocerámicas bifásicas compuestas por tricalcio fosfato (TCP) e hidroxiapatita (HA) o un tamaño nano de partículas de hidroxiapatita con una alta relación superficie-volumen (Garai y Sinha, 2014).

En resumidas cuentas, aunque la HA y el β -TCP tienen una composición química similar, difieren en su capacidad de reabsorción biológica. Las cerámicas de HA densas cuando se unen como implante óseo son casi no reabsorbibles y bioinertes. Mientras que las cerámicas que contienen β -TCP poroso muestran afinidad por la degradación biológica de alta velocidad, son bioactivos y biorreabsorbibles. Igualmente, es necesario destacar que el material de injerto ideal debe ser biorreabsorbible para permitir el crecimiento del hueso en el hospedador. El injerto debe ser osteoconductor y debe permitir la sustitución de hueso nuevo en el sitio del injerto (Bansal y cols., 2014).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

1.6.1.3. Las cerámicas bifásicas.

El desarrollo de fosfato de calcio de dos fases o cerámicas de fosfato cálcico bifásicas con >99% de estructura cristalina consistente en un 60% de HA y un 40% de β -TCP en forma de partícula, hizo posible controlar la capacidad de reabsorción del β -TCP y al mismo tiempo mantener su propiedad osteoconductiva (Garai y Sinha, 2014); además de acelerar la biorreabsorción de la HA. De este modo, estas cerámicas pueden ser clasificadas como reabsorbibles por su contenido en β -TCP, a la vez que, la presencia de HA en la estructura retrasa la reabsorción del material permitiendo su presencia en el organismo el tiempo necesario para la formación del nuevo callo óseo. Por tanto, las cerámicas bifásicas aloplásticas (HA/ β -TCP) pueden considerarse como un adecuado material de relleno óseo, puesto que posee propiedades potencialmente interesantes, como la propiedad osteoconductiva formadora de hueso y la capacidad de ser biorreabsorbidas (Bansal y cols., 2014). Por tanto, poseen aplicaciones biomédicas gracias a que sus constituyentes están presentes en la formación del hueso y de los dientes (Valentim y cols., 2018).

El éxito de esta estrategia depende en gran medida de las propiedades del material de la matriz (como su biocompatibilidad, osteoconductividad y grado de degradación) y de la arquitectura de la matriz (su porosidad, el tamaño del poro y la morfología de la superficie) (Garai y Sinha, 2014; Yu y cols., 2017; Valentim y cols., 2018; Hongshi y cols., 2018; Millan y cols., 2018). Gracias a esta característica inductiva el poro de esta cerámica permite alcanzar una mejor regeneración incluso en grandes defectos óseos, sin la adición de factores de crecimiento exógenos (Yu y cols., 2017; Hongshi y cols., 2018).

La principal característica de las cerámicas bifásicas es que tanto la HA como el β -TCP son osteoconductivos (Garai y Sinha, 2014; Yang y cols., 2014). Esta propiedad osteoconductiva puede estimular la unión de las células formadoras de hueso desde el hospedador, así como la migración celular y la formación de vasos sanguíneos. De este modo, HA y β -TCP pueden liberar activamente iones de calcio y de fosfato influyendo en la concentración iónica local con el fin de desencadenar y proporcionar la fuente necesaria para la deposición de calcio en la matriz y así favorecer su posterior remodelación (Yang y cols., 2014). Por esta razón, las cerámicas bifásicas tienen la capacidad de formar fuertes uniones directas con el hueso del huésped, lo que resulta en

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

una resistente interfase si se compara con materiales bioinertes o intolerantes que forman una interfase fibrosa. Histológicamente, se ha demostrado que este sustituto óseo se integra completamente en una red secundaria formada por hueso esponjoso, dando lugar a una organización ósea casi completa de la antigua área del defecto (Bansal y cols., 2014). En consecuencia, las matrices de HA/ β -TCP son los materiales bioactivos más adecuados para la implantación en áreas de soporte de carga, pudiendo proporcionar una estabilidad estructural inicial (Yang y cols., 2014; Bansal y cols., 2014).

Además, la hidroxiapatita y el beta-fosfato tricálcico han demostrado tener una buena biocompatibilidad debido a que están compuestos por los mismos iones que el principal componente mineral del hueso. Este hecho también se traduce en que presenten una gran osteoconductividad y porque no produce toxicidad sistémica o reacción inmunológica (Garai y Sinha, 2014; Yang y cols., 2014).

Igualmente, el grado de disolución de las cerámicas es uno de los factores más importantes a controlar. Un adecuado nivel de solubilidad del material, proporciona un adecuado crecimiento de nuevo tejido óseo al permitir su degradación al unísono. Por el contrario, el desarrollo de una cerámica muy soluble, proporciona un gradiente de iones de calcio extremadamente perjudiciales para la actividad de los osteoclastos. Dado que la solubilidad de la cerámica depende, principalmente, de la relación HA/ β -TCP, han sido numerosos los estudios enfocados en determinar la más adecuada proporción entre ambos componentes. En respuesta a la degradación de la cerámica (es decir, mediante su solubilidad y actividad de reabsorción) y dependiendo del ratio HA/ β -TCP, algunos iones libres liberados pueden subsistir cerca de las células progenitoras del hueso, pudiendo desencadenar la diferenciación osteogénica, participando, así, en la formación de nuevo hueso. Por ejemplo, los osteoblastos se ven influidos directamente por los cambios en la concentración del ión calcio en el microambiente del hueso y la diferenciación osteoblástica de las células madre mesenquimales se acompaña de la expresión de proteínas que se unen al calcio e incorporación del ion calcio en la matriz extracelular. Además, el aumento de fosfato inorgánico también se ha demostrado que actúa como una señal específica, afectando la expresión de varios genes implicados en la proliferación, diferenciación, mineralización y apoptosis de células esqueléticas. Más precisamente, el fosfato regula la expresión de varios procesos de mineralización asociados a genes como la osteopontina (OPN) y la proteína Gla de la matriz. Por tanto, ello demuestra que la

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

liberación mantenida de fosfato regula positivamente la mineralización (Bouler y cols., 2018).

Numerosas investigaciones han mantenido que la respuesta inflamatoria, especialmente la inflamación crónica, inducida mediante las cerámicas bifásicas trasplantadas y sus productos de solubilidad (citoquinas) pueden contribuir a la formación de hueso ectópico favoreciendo la diferenciación celular a través de la interacción con la matriz celular (Yang y cols., 2014; Jain y cols., 2014; Hongshi y cols., 2018).

Las características estructurales de las cerámicas a nivel macro y micrométrico también se han establecido como posibles influencias en el potencial osteoinductivo de estos biomateriales (Yang y cols., 2014). Así mismo, la topografía de la superficie y la rugosidad del biomaterial a un nivel micrométrico y nanométrico afectan a la unión, la señalización, la proliferación y la diferenciación de las células. Con el fin de favorecer la regeneración ósea y la osteointegración es esencial que las matrices de la ingeniería tisular ósea proporcionen un estímulo bioactivo, osteogénico y osteoconductor en el sitio del defecto. Por tanto, la manipulación de la topografía de la superficie ofrece una estrategia efectiva y directa para mejorar el rendimiento biológico del material de la matriz (Costa y cols., 2013).

Además de la macroporosidad, las características de la superficie como el tamaño de los poros y la presencia de microporos también han demostrado ser importantes en el proceso de inducción de formación ósea. Los microporos amplían el área de la superficie lo que facilita el intercambio de iones y la creación de apatita similar al hueso, y/o acompañado de la unión de hueso endógeno que inducen a las proteínas de superficie. Estas ventajas de la microporosidad pueden afectar positivamente a la adhesión, proliferación y diferenciación de las células formadoras de hueso. Igualmente, se ha demostrado que la microestructura de los materiales tiene una influencia directa en la forma y en la vía de señalización celular y, con ello también, el destino final de las células (Yang y cols., 2014).

El diseño de las características de la superficie de las matrices y del implante dependen de la aplicación deseada. La inhibición osteoclástica favorece la estabilidad del implante para la artroplastia total de cadera, mientras que los biomateriales sintéticos reabsorbibles están destinados a ser degradados mediante una reabsorción osteoclástica y

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

una disolución físico-química. Tanto los osteoblastos como los osteoclastos juegan un papel en la curación de los huesos, en el desarrollo y remodelación ósea; y sus actividades complementarias son una característica definida de la interface biomaterial-hueso. Por tanto, esto es importante para evaluar la interacción tanto de los osteoblastos como de los osteoclastos con los biomateriales. Además, para muchas aplicaciones, sería beneficioso identificar las características de la superficie que podrían resultar ser óptimas para promover la formación de hueso mediante los osteoblastos, mientras que la supresión de la actividad de reabsorción de los osteoclastos. Sin embargo, solo unos pocos estudios han investigado sobre la reabsorción de las superficies de los biomateriales por los osteoclastos (Costa y cols., 2013).

En resumen, tanto la HA como el β -TCP cumplen los requisitos de los biomateriales sintéticos, esto es, no presentan propiedades tóxicas, antigénicas o carcinogénicas, siendo además estables después de su esterilización y su elaboración supone un coste relativamente bajo. Asimismo, extensas investigaciones de las cerámicas bifásicas como materiales de injerto óseo en la reparación de defectos óseos y periodontales han demostrado producir resultados más favorables que otro tipo de materiales ya que tienen el potencial de completar el proceso de regeneración en defectos óseos de tamaño crítico (Yang y cols., 2014; Jain y cols., 2014).

1.6.2. Cerámicas bifásicas y CMM

Las cerámicas de fosfato de calcio, a pesar de tener una composición química similar al hueso y de poseer propiedades osteoconductoras, carecen de la osteogénesis necesaria para estimular la curación ósea en defectos de tamaño crítico, lo que limita su uso clínico a defectos de tamaño reducido donde la osteoconducción es suficiente (Gamblin y cols., 2014).

El cultivo *in vitro* de las CMM en las cerámicas bifásicas permite su diferenciación en osteoblastos incluso sin la aplicación de suplementos osteogénicos. La formación *in vivo* de hueso se consigue mediante la implantación de estas células cultivada en la matriz cerámica en los defectos de tamaño crítico. Las CMM son conocidas, además de por sus propiedades regenerativas, también por sus propiedades inmunoregulatoras. Esto se ha demostrado en numerosos estudios al observar que se

produce un reclutamiento de las CMM del huésped al sitio de la lesión al trasplantar dichas células estimulando así, la curación ósea (Gamblin y cols., 2014).

Al implantar el biomaterial en el sitio del desperfecto óseo, se espera una reacción inflamatoria por parte del huésped como respuesta del mismo a la presencia de un cuerpo extraño. Durante la reacción inflamatoria innata, los monocitos que circulan en la sangre se convierten en macrófagos tisulares. Numerosas investigaciones afirman que las CMM pueden regular el equilibrio de los macrófagos M1/M2 a favor de M2 produciendo un fenotipo antiinflamatorio mediante la secreción de algunos inductores de M2 como la IL-4, IL-13, IL-16 y la prostaglandina E2. El hueso es esencial para un funcionamiento adecuado del sistema inmunológico ya que las células inmunes se originan en la médula ósea; sin embargo, la importancia de estas células en la formación de hueso no es tan conocida. No obstante, los desórdenes en la formación ósea se presentan en las enfermedades autoinmunes y recientemente se ha sabido que la supresión de los macrófagos inhibe la curación ósea intramembranosa. Así pues, la contribución de los macrófagos a la formación ósea no es del todo clara. Sin embargo, mientras que la actividad osteoclástica se asocia, generalmente, con la reabsorción ósea, se ha demostrado mediante estudios *in vitro*, que los osteoclastos secretan mediadores que inducen la migración y la diferenciación osteogénica de las CMM. Aun así, la influencia de las CMM trasplantadas sobre la actividad osteoclástica durante la formación ósea *in vivo* es aún desconocida (Gamblin y cols., 2014).

El estudio desarrollado por Gamblin y cols. en 2014 (Gamblin y cols., 2014) demostró que la implantación de CMM con cerámicas bifásicas daba lugar a un aumento en 15 veces a la formación de hueso si se compara con la utilización de una matriz de cerámica bifásica aislada. El resultado de esta investigación está en concordancia con otros estudios en defectos óseos críticos que expresan un beneficio en la formación ósea si se implantan CMM en cerámicas compuestas por hidroxiapatita y beta-fosfato tricálcico. Sin embargo, los mecanismos exactos mediante los cuales las CMM median la inducción ósea no se conocen completamente. Años atrás, se pensaba que los efectos terapéuticos de las CMM yacían en su capacidad de diferenciarse en células de distintas estirpes, es decir, en los osteoblastos formadores de hueso en el caso de la ingeniería tisular ósea. No obstante, en este estudio las CMM presentes en el defecto óseo desaparecían completamente del sitio de implantación a las 2-4 semanas y el nuevo hueso

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

se formaba exclusivamente a partir del tejido hospedador. Este hecho sugirió que las CMM facilitan, pero no participan directamente en la formación de hueso. De hecho, se ha demostrado previamente que los gránulos de fosfato cálcico trasplantados ectópicamente inducen el reclutamiento de las CMM desde la médula ósea del hospedador al sitio donde las partículas de fosfato de calcio se han implantado para formar el nuevo tejido óseo. Por otra parte, estos gránulos de cerámicas bifásicas inician el reclutamiento de los monocitos/macrófagos, que se ve significativamente potenciada mediante la adición de CMM, hecho que se traduce en la formación de hueso de mayor calidad en comparación con el producido a partir de las cerámicas bifásicas (Gamblin y cols., 2014).

Asimismo, los resultados del estudio desarrollado por Vahabi y cols. en 2012 (Vahabi y cols., 2012) revelaron que la capacidad de formación ósea es menor en las cerámicas bifásicas que aquellas que se asocian con CMM (Vahabi y cols., 2012). Al igual que encontraron una menor respuesta inmunológica por parte del organismo huésped. En un estudio similar, Jafarian y cols. en 2008 (Jafarian y cols., 2008) afirmaron que la aplicación de HA y β -TCP en combinación con CMM produce una mayor formación de hueso que si se aplica únicamente el biomaterial. En el análisis microscópico se observó que el hueso formado a partir de cerámicas bifásicas asociadas a CMM era mucho más compacta con menos espacios medulares, así como la presencia de más osteocitos en las lagunas óseas. Este hecho se atribuyó a la capacidad de diferenciación de las CMM en osteoblastos. De igual modo, Wu y cols. en 2006 (Wu y cols., 2006) aseguraron que la implantación de matrices de cerámicas bifásicas con osteoblastos después del aislamiento de CMM-MO en el sitio del defecto óseo crítico también producía una mayor cantidad y calidad de hueso (Wu y cols., 2006; Vahabi y cols., 2012).

En resumen, las células madre mesenquimales favorecen de forma significativa la formación de hueso en los defectos óseos críticos. Existe una gran controversia en afirmar si las CMM participan directamente en la osteogénesis, lo que está claro es que aumentan la respuesta inmune innata y aceleran el reclutamiento de los monocitos en el lugar de la implantación del biomaterial, donde se diferenciarán en macrófagos y en osteoclastos; estimulando así la formación ósea *de novo*. Por todo ello, se prefiere la aplicación de

cerámicas bifásicas asociadas a células madre mesenquimales con el objetivo de obtener mayor cantidad de hueso y de propiedades mecánicas superiores (Gamblin y cols., 2014).

1.7. MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN LAS INVESTIGACIONES *IN VIVO* DE LA INGENIERÍA TISULAR ÓSEA

Con antelación a la aplicación clínica de los materiales que se emplean en la ingeniería tisular ósea es imprescindible comprender la cascada de procedimientos que forman parte de la regeneración ósea con el fin de analizar la eficacia de las reconstrucciones en estudios *in vitro* e *in vivo*. Por tanto, es necesario determinar un adecuado modelo animal para poder recrear un defecto óseo *in vivo* de suficientes dimensiones que no pueda sanar espontáneamente. Estos modelos hacen la función de guía con el objetivo de diseñar adecuados estudios que serán traducidos clínicamente y de identificar los retos y desafíos que se deben superar en la elaboración de las matrices con el fin de lograr una excelente biocompatibilidad de los materiales para su posterior aplicación clínica (Binderman y cols., 2011; Gothard y cols., 2014). Por estas razones, los modelos animales deben ser cuidadosamente seleccionados con el fin de obtener el mejor ambiente óseo *in vivo* que permita obtener resultados clínicos lo más próximos a la realidad en la especie humana. Para ello, se debe escoger la especie animal más adecuada dependiendo, no solamente de lo que se quiera estudiar, sino también teniendo en cuenta la existencia de ciertas variables que afectan a la eficacia de las construcciones *in vivo* obtenidas a partir de la ingeniería tisular (Gothard y cols., 2014; Malhotra y cols., 2014).

1.7.1. Factores implicados en la elección del modelo animal

Los factores a considerar para la elección del modelo animal más apropiado son, entre otras, la localización anatómica y el tamaño del defecto óseo, la especie, la edad, la estructura y complejidad ósea del animal, así como su estado de salud, su coste de adquisición y su disponibilidad. Igualmente, se deben examinar las condiciones de carga mecánica, el estrés al que es sometido el animal durante el tiempo que dure la investigación, la presencia de periostio y tejidos blandos adyacentes al defecto óseo, la vascularización de la zona y, por último, y más importante, las características anatómicas, fisiológicas y fisiopatológicas análogas a los seres humanos (Muschler y cols., 2010; Gardel y cols., 2014). Todo ello con el objetivo de crear un ambiente que sea lo más cercano posible al escenario clínico donde la terapia será usada. Otros factores a tener en

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

cuenta, son las preocupaciones éticas, la existencia de suficientes conocimientos sobre la biología y manejo de la especie animal que se vaya a estudiar, el nivel de actividad normal del animal, su resistencia frente a las infecciones, el periodo de tiempo que dura el estudio *in vivo* poder obtener resultados perceptibles y la tolerancia de la especie animal al cautiverio y al proceso quirúrgico que será llevado a cabo (Muschler y cols., 2010; Gothard y cols., 2014; Pilia y cols., 2013; Gardel y cols., 2014). Todo lo comentado anteriormente es fundamental para la posterior extrapolación de los resultados a la situación humana (Gardel y cols., 2014). Por otra parte, un modelo animal debe proveer los mismos o similares resultados en los experimentos repetidos en los mismos laboratorios y en experimentos idénticos en laboratorios diferentes (reproductibilidad). Además, los modelos deben permitir detectar diferencias en los resultados por cambios en una variable (sensibilidad), así como permitir que el diseño experimental aísle variables independientes para la evaluación (especificidad) (Muschler y cols., 2010; Pilia y cols., 2013).

Una vez que se determina el tipo de animal en el que se realizará la investigación, se debe tener la capacidad de proporcionar a los animales los cuidados físicos apropiados, no solamente durante el estudio sino también una vez finalizado (Pilia y cols., 2013).

Por otra parte, el tamaño del defecto debe ser igualmente considerado para asegurar la cantidad de injerto necesario para que se produzca la regeneración del hueso afectado. Así, los defectos de tamaño crítico se definen como “la herida intraósea de tamaño más pequeño en un determinado hueso y especie animal que no puede curar espontáneamente durante la vida media del animal” o como un defecto, que muestra menos del 10% de regeneración ósea durante la vida media del animal. Sin embargo, esto ha sido redefinido como deficiencias en el hueso segmental de una longitud que excede los 2- 2’5 veces el diámetro del hueso afectado (Muschler y cols., 2010; Gardel y cols., 2014).

Por tanto, los criterios clave de estos modelos y estudios son: i) administrar la terapia de la misma manera que será administrada en el escenario clínico; ii) utilizar una localización anatómica del defecto similar a donde se usara clínicamente (características locales del tejido: presencia de grasa, músculo, tejido fibroso y aporte vascular); iii) utilizar técnicas quirúrgicas que coincidan o sean lo más análogas posibles a los métodos

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

clínicos; iv) disponer de una especie animal que proporcione un campo metabólico y capacidad de respuesta fisiológica similar los humanos, y v) usar un material de injerto que tenga la misma composición y propiedades de degradación como la formulación que será usada clínicamente.

Como resultado, la evaluación preclínica en esta área puede ser complicada por la necesidad de identificar y utilizar una especie animal que tenga una capacidad de respuesta comparable a los humanos (Muschler y cols., 2010).

1.7.2. Animales más frecuentemente utilizados en los estudios *in vivo* sobre la regeneración ósea.

La revisión de la literatura realizada por O'Loughlin y cols. en 2008 (O'Loughlin y cols, 2008) demostraron claras preferencias por parte de los investigadores hacia ciertas especies animales, destacando la utilización de ratas en un 38% de los estudios, seguido por los conejos en un 19%, los ratones en un 15% y con menor frecuencia, por las ovejas en un 11% de los casos, los perros en un 9% y las cabras en un 4% de los resultados. El 4% restante está compuesto por una amplia selección de modelos animales investigados con menos frecuencia (Gothard y cols., 2014). La posible explicación a la preferencia en utilizar modelos animales de pequeño tamaño en los estudios sobre la ingeniería tisular ósea puede encontrarse en el hecho que el concepto de los materiales bifásicos es relativamente reciente en el campo de la regeneración ósea, por lo que sería comprensible que los investigadores decidan estudiar la reconstrucción ósea primero en un animal pequeño con el fin de determinar el rendimiento inicial del biomaterial, y así, según los resultados que se arrojen en estas investigaciones, recurrir a un modelo animal más grande (Gothard y cols., 2014; Pilia y cols., 2013; Jiang y cols., 2018).

Actualmente, ningún único modelo animal ofrece una comparación representativa con la regeneración ósea que se desarrolla en la especie humana; más bien, cada modelo animal se selecciona para hacer frente a una particular pregunta de investigación en relación a los defectos óseos (Gothard y cols., 2014).

De cualquier modo, cabe destacar que tanto el grupo de modelos animales de pequeño tamaño como los de gran tamaño tienen una serie de ventajas e inconvenientes comunes entre ellos. En efecto, el empleo de animales de gran tamaño se debe,

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

principalmente, a dos razones: i) los mecanismos de regeneración ósea en animales grandes y humanos es similar debido a que exhiben características favorables en lo referente a la estructura y remodelación del hueso, a los valores de densidad mineral ósea y por presentar modestas diferencias en la densidad ósea cortical y trabecular en diversas localizaciones; además de mínimas diferencias en respuesta a los procedimientos de ovariectomía, a las restricciones dietéticas de calcio, a la magnitud de dimorfismo sexual, a la edad a la que se alcanza el pico de masa ósea, y a la velocidad y el grado en el que el sistema de Havers se remodela donde el hueso laminar plexiforme se reemplaza por hueso cortical; ii) la facilidad en la realización de procedimientos quirúrgicos (Gordeladze y cols., 2010; Muschler y cols., 2010; Gardel y cols., 2014). Sin embargo, tienen altos costes de experimentación y de mantenimiento y, a menudo, dificultan la garantía de un tamaño de la muestra adecuada. Además, la observación de la formación, a corto plazo, de callo óseo en el sitio del defecto no es sencillo; siendo los mecanismos celulares y moleculares de la reparación ósea difíciles de dilucidar. Por tanto, obligan a realizar experimentos a largo plazo para poder evaluar los resultados. Igualmente, se requiere un elevado tiempo para el procesamiento de las muestras que limita los métodos adecuados para su evaluación (Gordeladze y cols., 2010; Jiang y cols., 2018). No obstante, existen ciertos escenarios en donde los estudios de viabilidad de los injertos deben ser realizados en animales grandes, como conejos, perros, ovejas o cabras. Estas circunstancias están, generalmente, limitadas a unas pocas situaciones: 1) el procedimiento quirúrgico no puede ser reproducido en un animal pequeño, 2) el tamaño del implante o dispositivo bajo estudio excede la capacidad de volumen de un animal pequeño y, 3) exigencia de obtener efectos de grandes distancias de difusión o volúmenes como en el caso de la difusión de oxígeno en la supervivencia de las células trasplantadas (Gardel y cols., 2014).

En comparación a los modelos de gran tamaño, los modelos animales de dimensiones reducidas utilizados en las estrategias de la ingeniería tisular ósea tienen los beneficios de ser fáciles de manejar por su reducido tamaño, los procedimientos quirúrgicos son relativamente simples al igual que los cuidados pre y postoperatorios requeridos y la amplia literatura disponible sobre este tipo de animales (Gordeladze y cols., 2010; Gothard y cols., 2014; Muschler y cols., 2010). Igualmente, tienen una elevada biodisponibilidad por su bajo coste y facilidad de cría, lo que a su vez permite obtener tamaños de muestra grande. Del mismo modo, se puede estudiar la supervivencia

y el destino de las células sembradas y la degradación de los materiales implantados (Gordeladze y cols., 2010). Asimismo, los resultados pueden determinarse tras un relativo corto periodo de tiempo de observación (días o semanas), donde las muestras están disponibles rápidamente y las variaciones en la radiografía, en el análisis de imagen y en los resultados histológicos y bioquímicos entre los individuos son pequeñas por lo que se reduce el número de animales que se necesitan para alcanzar una evaluación estadísticamente significativa (Gardel y cols., 2014). Al ser el corto en el tiempo el proceso de obtención de las muestras y su posterior fijación y descalcificación, permite avanzar en las investigaciones de la ingeniería tisular (Gordeladze y cols., 2010). Sin embargo, siguen creciendo a lo largo de su vida y, por tanto, reflejan muy débilmente el modelado y remodelado óseo con respecto al hueso humano (Muschler y cols., 2010). En los roedores las placas de crecimiento siguen estando abiertas por lo que el contenido de hueso trabecular es limitado. Además, hay una nula actividad de osteoclastos en la remodelación del sistema de Havers. Debido a las características de su tamaño y peso corporal presentan serias limitaciones a la hora de obtener resultados clínicos por las dimensiones del defecto óseo que se requiera realizar obstaculizando la traducción clínica y la elaboración de estudios a largo plazo; además de poseer importantes implicaciones éticas (Gothard y cols., 2014; Pinheiro y cols., 2014). Estos son factores relevantemente negativos a tenerlos en cuenta si consideramos a los roedores modelos apropiados para el estudio de la biología ósea humana (Gardel y cols., 2014).

Por todo lo mencionado anteriormente, a continuación, se describirán las distintas especies animales que se utilizan en las citadas investigaciones con el fin de obtener una comprensión más detallada de estos modelos.

1.7.2.1. Modelos animales de pequeño tamaño

- **Roedores**

Los roedores (ratas y ratones), tan frecuentemente utilizados por los estudios sobre regeneración ósea con biomateriales y células madre, forman parte de la especie animal más pequeña en los que se investiga la regeneración ósea y se utilizan, principalmente, para analizar las propiedades citotóxicas de las matrices (Gothard y cols., 2014; Pilia y cols., 2013). Además de las características anteriormente citadas, ofrecen ciertas peculiaridades como el hecho de la baja tasa de rechazo que presentan frente al material *Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis*

allogénico implantado debido a su estado de inmunodeficiencia, una vida útil que permite la elaboración de investigaciones relacionadas con la edad y una composición bioquímica ósea similar al hueso humano. Sin embargo, presentan un inconveniente característico que es su elevado nivel de remodelación ósea, lo que se traduce en una alta tasa de curación del hueso lesionado (Gothard y cols., 2014).

- **Conejos**

Los conejos, que representan la segunda especie animal más utilizada, muestran una curación ósea más simple, rápida y estable que la raza humana junto a un elevado índice de remodelación ósea (Gothard y cols., 2014; Pilia y cols., 2013).

En esta especie de animal, hay que considerar la existencia de un espesor cortical medular menor a la hora de realizar estudios sobre defectos óseos mandibulares (Pinheiro y cols., 2014).

- **Cerdos miniature**

Otro modelo animal de tamaño pequeño que se emplea en este tipo de estudios son los “mini pigs” (cerdos miniatura), animales que presentan una tasa reducida de crecimiento y masa corporal y con una densidad mineral, composición química, morfología y curación ósea similar a los humanos (Gothard y cols., 2014). Además, tienen estrechas similitudes a la especie humana en términos de número de plaquetas, parámetros de coagulación, tasa metabólica, estructura ósea y características de las células madres mesenquimales, proporcionando una buena representación de las investigaciones basadas en pacientes individuales (Stramandinoli-Zanicotti y cols., 2014). No obstante, pueden ser menos apropiados que otras especies de pequeño tamaño pues, debido a su enanismo genético, son menos similares biológicamente a los humanos (Muschler y cols., 2010).

Aunque los experimentos *in vivo* que utilizan animales de reducido tamaño proporcionan el potencial terapéutico de un tratamiento, existen muchas diferencias fundamentales entre estos pequeños animales y los seres humanos. Antes de aplicar la terapia a los pacientes, los estudios en grandes animales son un prerrequisito para validar la eficacia en un modelo animal más relevante para los humanos. El desarrollo de modelos preclínicos en grandes animales requiere el uso de líneas celulares animales bien

caracterizadas que sean similares a sus homólogos humanos (Stramandinoli-Zanicotti y cols., 2014). Estos modelos animales presentan, igualmente, ciertas características similares a la especie humana aumentando la fiabilidad de los resultados obtenidos en las investigaciones (Gothard y cols., 2014). De este modo, son el peso corporal, la composición química y la densidad mineral ósea las propiedades que se asemejan en gran medida a la naturaleza de los seres humanos (Gothard y cols., 2014; Pilia y cols., 2013). En cambio, son las implicaciones éticas, los altos costes económicos de su adquisición y el hecho de ser animales cuadrúpedos, las características que dificultan, en cierto modo, la traducción clínica de los resultados obtenidos (Gothard y cols., 2014).

1.7.2.2. Modelos animales de gran tamaño

- **Ovejas**

Las ovejas, animales ampliamente utilizados en los análisis *in vivo* de la ingeniería tisular, presentan numerosas características muy similares a los seres humanos, además de las señaladas anteriormente, como el envejecimiento de los huesos, la remodelación ósea dependiente de la edad y, por último, las células madre derivadas de la médula ósea, tan semejantes a las de la especie humana (Gothard y cols., 2014; Kalaszczynska y cols., 2013). Sus largos huesos permiten el estudio de muchos sistemas de fijación interna usados en la práctica clínica con los seres humanos (Muschler y cols., 2010; Gardel y cols., 2014). Otras ventajas menos relevantes son la considerable literatura disponible y el hecho de ser animales dóciles (Gothard y cols., 2014). Todas estas virtudes, les hace ser el modelo animal de gran tamaño más recomendado para el análisis de los sustitutos óseos (Malhotra y cols., 2014; Kalaszczynska y cols., 2013). Sin embargo, además de ser frágiles cuando no se encuentran en grupo con sus semejantes, el ritmo de remodelación ósea de estos animales depende de su edad presentando una renovación de los sistemas de Havers alrededor de los 7-9 años de edad (Muschler y cols., 2010; Gothard y cols., 2014; Pilia y cols., 2013); además de presentar una elevada resistencia mecánica en los individuos adultos y una densidad mineral ósea trabecular muy superior a la especie humana (Gothard y cols., 2014).

- **Perros**

Otros animales de gran tamaño que también se aplican en las investigaciones son los perros. Estos animales cuentan con la virtud de ser fácilmente manejables debido a su naturaleza dócil y contar con una amplia literatura en lo referente a su comportamiento biológico. Igualmente, presentan una fácil crianza y accesibilidad. Una amplia literatura sostiene que los modelos caninos continúan siendo los preferidos, particularmente, en los estudios sobre biología de la médula ósea e inmunología de los trasplantes. Si bien, existe una gran variedad de resultados entre las distintas razas, además de una elevada tasa de remodelación ósea, resistencia mecánica, una unión ósea muy resistente alcanzada a mayor velocidad que en la raza humana y, sobre todo, numerosas preocupaciones éticas y sociales al ser considerados como animales de compañía (Muschler y cols., 2010; Gothard y cols., 2014; Pilia y cols., 2013). Pese a todo ello, el modelo canino es la especie animal más comúnmente utilizada para recrear defectos óseos mandibulares (Adam y cols., 2014).

- **Cabras**

En lo que se refiere a las cabras como modelos animales empleados en dichas investigaciones, tienen la ventaja de presentar un gran tamaño corporal que permite las implantaciones múltiples, presentan una tasa de remodelación ósea similar a los seres humanos y muestran una elevada tolerancia a las condiciones ambientales que se emplean durante el periodo de tiempo que dura el estudio. Igualmente, presentan menos masa muscular y toleran mejor el estrés del aislamiento. Por el contrario, dificulta, en cierto modo, la traducción clínica de los resultados obtenidos por su pronta cicatrización ósea debido a su elevado índice de angiogénesis (Muschler y cols., 2010; Gothard y cols., 2014).

- **Cerdos**

Con mucha menos frecuencia se utilizan cerdos que presentan una anatomía y microestructura ósea similar a los humanos. Sin embargo, son agresivos y difíciles de manejar; siendo sus principales inconvenientes como modelo animal, el gran tamaño, el excesivo peso corporal, sus huesos cortos y de gran espesor y el acelerado ritmo de crecimiento óseo afectando sobre todo a las investigaciones de matrices que recibirán

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

importantes cargas mecánicas al dificultar la diferenciación entre una remodelación temprana o tardía del hueso (Gothard y cols., 2014; Pilia y cols., 2013).

- **Primates no humanos**

Los primates son frecuentemente utilizados como modelo de elección para los estudios sobre los métodos de regeneración y reparación ósea. Esto se basa en argumentos de proximidad evolutiva y similar estructura anatómica, endocrina, digestiva y características dietéticas e inmunológicas (Gothard y cols., 2014). Sin embargo, es difícil considerarlos como el gold-standard para los trabajos en regeneración de la masa ósea. El tamaño del defecto es una importante limitación en los monos verdes africanos y en los monos Rhesus. Sólo el mono babuino se acerca al tamaño esquelético que los humanos comparten con los perros, ovejas y cabras. Además, estos animales muestran un profundo dimorfismo sexual mucho más que los humanos. Igualmente, existe una heterogeneidad en las respuestas biológicas entre los distintos primates no humanos que disminuyen el argumento basado en la proximidad evolutiva necesariamente equivale a una mejor predicción clínica. Su coste de adquisición es elevado y presenta ciertos inconvenientes, tales como intensos cuidados de manejo o inmovilización o las cuestiones éticas relacionadas con su uso creciente en las investigaciones (Gothard y cols., 2014). Sin embargo, estos diversos aspectos no proporcionan la suficiente evidencia para asegurar que alguna de las anteriores especies represente mejores características para el estudio de la biología ósea humana (Muschler y cols., 2010). Por tanto, es necesario establecer un modelo de defectos de tamaño crítico en animales pequeños (Gordeladze y cols., 2010).

En resumidas cuentas, estudios anteriores han demostrado que la osteoinducción llevada a cabo por los biomateriales de la ingeniería tisular ósea ocurre predominantemente en grandes animales, mientras que en aquellos de menor tamaño la incidencia de formación ectópica de hueso es relativamente más baja. La razón de estas diferencias entre las distintas especies animales aún no está totalmente definida. Los experimentos en grandes modelos animales se encuentran asociados, principalmente, con problemas de disponibilidad limitada, alto coste económico y preocupaciones éticas, tal y como se comentaba anteriormente. Por tanto, las investigaciones con este tipo de modelo animal implican muestras de tamaño relativamente reducido, lo que se traduce en una limitada fiabilidad de los estudios, ya que diversos autores han demostrado una

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

variación en la cantidad de hueso formado no sólo entre las distintas especies, sino también entre los individuos de la misma especie, haciendo que el volumen de la muestra en este tipo de estudios sea de gran importancia (Pilia y cols., 2013).

Por el contrario, analizar la osteoconductividad de los biomateriales en pequeños animales, tales como las ratas y ratones, no solo permite estudios con muestras de mayor tamaño, sino que también posibilita la realización de un análisis inmunohistoquímico en mayor profundidad, los cuales son fácilmente disponibles para las investigaciones en esta clase de animales. Estos análisis en profundidad podrían proporcionar una visión más clara de los mecanismos biológicos que dirigen la inducción ósea mediante los biomateriales sintéticos (Gothard y cols., 2014).

Por todo lo comentado anteriormente, los estudios de modelos animales necesitan ser mejorados para una mayor predicción de la efectividad de las estrategias en el tratamiento en los ensayos clínicos (Jiang y cols., 2018). Así, los modelos animales disponibles son deficientes en predecir el rendimiento clínico por lo que han sido evaluadas varias causas posibles de la disparidad entre los resultados de los estudios animales y los ensayos clínicos, incluyendo fallos en el conocimiento de las limitaciones de los modelos animales, inadecuada información de la biología ósea de las distintas especies conllevando a sobreestimación de la eficacia del tratamiento y subestimación en variaciones de la respuesta clínica (Gardel y cols., 2014; Jiang y cols., 2018). Estos problemas deberían ser tenidos en cuenta, así como un conocimiento más exhaustivo de las diferencias de hueso (características macroscópicas, microscópicas y de remodelado) en el diseño y ejecución de los modelos animales preclínicos que involucran terapias basadas en células madre óseas. Probablemente, una combinación de los diferentes modelos animales para las diferentes estrategias de regeneración de hueso mejoren la interpretación de los estudios *in vivo* (Jiang y cols., 2018).

II.JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

La regeneración ósea es un proceso fisiológico, complejo que supone la formación de nuevo hueso poniéndose de manifiesto durante la cicatrización normal de las lesiones óseas y está implicada en la continua remodelación del tejido óseo que se produce durante la vida adulta. No obstante, existen situaciones clínicas que requieren grandes cantidades de estructura ósea por lo que este proceso se encuentra comprometido. El tratamiento convencional de estos defectos consiste en la utilización de injertos autólogos, alogénicos, xenogénicos y aloplásticos. Sin embargo, el limitado éxito de estas terapias en algunas circunstancias clínicas ha propiciado la investigación de una amplia variedad de biomateriales y el desarrollo de diversas terapias clínicas.

En los últimos años, los métodos de la ingeniería tisular ósea han sido considerados como un nuevo enfoque para reparar los defectos y para conseguir la regeneración tisular, constituyendo una alternativa a los injertos óseos. Esta modalidad terapéutica consiste en la construcción de biomateriales degradables constituidos por matrices porosas tridimensionales que sirven como soporte estructural para el posterior trasplante de células madre mesenquimales que se adhieran, proliferen y diferencien en la matriz y, en algunos casos, en la incorporación de factores de crecimiento adicionales para controlar el destino celular con el fin de generar y mantener la regeneración natural de la estructura ósea. Las cerámicas bifásicas formadas por HA y β -TCP son utilizadas satisfactoriamente como matrices tridimensionales en la regeneración de los defectos del hueso debido a sus propiedades físicas y químicas, y su similitud estructural al hueso natural. Por otra parte, las CMM se consideran una fuente ideal para las aplicaciones de la ingeniería tisular ósea por su capacidad de diferenciación en diversos tipos celulares, entre los que se encuentran los osteoblastos. Estas células se hallan en diversos tejidos del organismo, destacando la médula ósea y el tejido adiposo por ser fácilmente accesibles y proporcionar una cantidad adecuada de CMM.

La mayoría de los estudios publicados sobre regeneración ósea han usado CMM-MO puesto que la médula ósea ha sido considerada la principal fuente de células madre mesenquimales por su elevada tasa de aislamiento, gran capacidad proliferativa y elevado potencial de diferenciación. Sin embargo, esta fuente no está exenta de inconvenientes, *Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis*

entre las que destacan su proceso de obtención altamente invasivo, la alta morbilidad asociada a la obtención de células, el bajo rendimiento celular y la disminución de la potencia celular en los sucesivos pasajes. Como alternativa a estas limitaciones, en un estudio científico se describió el uso de estas células a través del aspirado de liposucción del tejido adiposo subcutáneo como una fuente rica en células madre mesenquimales.

Tradicionalmente, las CMM-A han sido obtenidas del tejido adiposo visceral, del tejido adiposo orbital y de las almohadillas adiposas, entre las que destacan las almohadillas de Hoffa. Aunque la fuente de obtención más comúnmente utilizada es el tejido subcutáneo del abdomen, también se ha recurrido frecuentemente a las regiones que rodean los músculos pectorales y glúteos y el fémur femoral. Sin embargo, estos procedimientos conllevan una serie de inconvenientes tales como la heterogeneidad de la población celular recogida, el inadecuado volumen aspirado, la morbilidad en el sitio donante y las complicaciones ambulatorias durante el periodo postoperatorio. Para evitar estos inconvenientes intra y postoperatorios, la cavidad oral contiene una masa de tejido adiposo especializado denominada BAB. Es una masa adiposa profunda localizada a ambos lados del rostro, entre el músculo buccinador y ciertos músculos más superficiales, incluyendo el músculo masetero, el cigomático mayor y el cigomático menor. En las últimas cuatro décadas, numerosos autores han utilizado la BAB como injerto autógeno para la reconstrucción de defectos maxilofaciales de pequeño y mediano tamaño, el tratamiento de las comunicaciones oronasales y oroantrales y del paladar hendido, la reconstrucción de la base del cráneo, de defectos en la región frontoorbitaria y cigomático-maxilar y de defectos intraorales por patologías malignas. Así como en intervenciones de palatoplastia, aumento malar y osteonecrosis de la mandíbula; para el tratamiento de la fibrosis submucosa oral, de las articulaciones anquilosadas y la rehabilitación tridimensional de grandes defectos alveolares. Igualmente se ha recurrido a sus beneficios como tratamiento para el cierre de la perforación de la membrana sinusal, de graves recesiones gingivales, de los defectos a nivel de la mucosa oral en casos de periimplantitis y para la revascularización pulpar. De todas las aplicaciones en las terapias de medicina regenerativa, cabe destacar su uso recientemente empleado para la obtención de CMM, denominadas células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat (CMM-BAB); debido a sus características y comportamiento presentan una alta similitud a las, más conocidas, células madre mesenquimales subcutáneas (CMM-SC).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

Esta nueva fuente para la obtención de CMM-A presenta numerosas ventajas puesto que la extracción de la BAB es un procedimiento con mínimas complicaciones que requiere una pequeña incisión con previa anestesia local ocasionando una escasa morbilidad en el sitio donante. En este sentido, las CMM-BAB pueden ser utilizadas en la ITO para la regeneración de DOTC maxilofaciales de pacientes sanos, pero sobre todo ante la presencia de enfermedades sistémicas que afectan al metabolismo óseo tales como la osteoporosis, donde los pacientes sufren una disminución de la masa y, sobre todo, de la densidad del tejido mineral óseo; por lo que se observa un incremento proporcional del número de osteoclastos maduros desarrollando un aumento de la reabsorción ósea; o como la DM tanto la DM tipo 1 como la tipo 2, patologías caracterizadas por una estructura ósea alterada consecuencia de la hiperglucemia crónica. Los pacientes con diabetes tipo 1 mal controlados con niveles de hiperglucemia mantenidos en el tiempo, además de poder sufrir con mucha probabilidad osteopatía diabética, van a tener una menor capacidad de regeneración ósea ante un DOTC como consecuencia de una disminución de los niveles de osteocalcina. Igualmente, es necesario resaltar la escasa mineralización de la estructura ósea cuando ambas patologías se presentan de manera concomitante en el individuo. Estas nuevas técnicas de ITO podrían aplicarse a pacientes que presentan simultáneamente diabetes y osteoporosis, como enfermedades independientes que aparecen en un mismo paciente, o como suele ser más frecuente, osteoporosis inducida por diabetes debido a la hiperglucemia crónica, a los productos finales de glicosilación avanzada y al estrés oxidativo. En este tipo de pacientes, se produce un efecto sinérgico de ambas enfermedades, que impide la regeneración ósea de los DOTCs con el uso exclusivo de biomateriales, por lo que la ITO podría permitir la regeneración ósea de estas lesiones.

Para poder llevar a cabo estos estudios es necesario establecer un adecuado modelo de experimentación animal que permita identificar los retos y desafíos para futuros ensayos clínicos en humanos. De este modo, en lo referente al campo para la regeneración ósea de los DOTCs; anatómicamente, la mandíbula de las ratas está formada por un par de huesos que no llegan a unirse en la vida adulta, a diferencia de otras especies. Estas dos superficies óseas están unidas por tejido fibroso representando un DOTC natural, motivo por el cual ha sido usado en tres estudios científicos como modelo de no unión congénita para poder investigar distintos métodos de regeneración ósea. Hasta la

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

fecha, sólo ha sido publicado un artículo científico en el que se usó este DOTC natural de la rata para comparar el tratamiento del defecto óseo con BC sola o cultivada con CMM-MO, pero sólo en animales sanos; no en animales diabéticos, osteoporóticos, o con diabetes y osteoporosis simultáneamente.

Por todas las razones comentadas anteriormente, el objetivo de este estudio fue comparar la eficacia de la formación de nuevo hueso en los DOTCs de la sínfisis de la rata mandibular empleando BC únicamente, como terapia convencional; BC cultivadas con CMM-MO considerando la médula ósea como el origen habitual de células madre mesenquimales y BC junto con CMM-BAB como terapia innovadora en ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis.

2.2. OBJETIVOS

El objetivo general fue estudiar el uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular en ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis.

El objetivo general puede ser desglosado en una serie de objetivos específicos que nos permitan sistematizar y responder a los diferentes aspectos que plantea nuestro estudio.

▪ **Objetivos específicos**

1. Estudiar radiológicamente el nivel de unión ósea de DOTCs de la sínfisis mandibular de rata, a las 4 y 8 semanas de ser tratados con BCs con o sin CMM-MO o CMM-BAB en animales sanos, diabéticos, osteoporóticos y diabéticos con osteoporosis.

2. Analizar la DMO de DOTCs de la sínfisis mandibular de rata, a las 4 y 8 semanas de ser tratados con BCs con o sin CMM-MO o CMM-BAB en animales sanos, diabéticos, osteoporóticos y diabéticos con osteoporosis.

3. Determinar histológicamente el nivel de unión ósea de DOTCs de la sínfisis mandibular de rata, a las 4 y 8 semanas de ser tratados con BCs con o sin CMM-MO o CMM-BAB en animales sanos, diabéticos, osteoporóticos y diabéticos con osteoporosis.

4. Valorar inmunohistoquímicamente la expresión de FCEV de DOTCs de la sínfisis mandibular de rata, a las 4 y 8 semanas de ser tratados con BCs con o sin CMM-MO o CMM-BAB en animales sanos, diabéticos, osteoporóticos y diabéticos con osteoporosis.

5. Estudiar inmunohistoquímicamente la expresión de BMP-2 de DOTCs de la sínfisis mandibular de rata, a las 4 y 8 semanas de ser tratados con BCs con o sin CMM-MO o CMM-BAB en animales sanos, diabéticos, osteoporóticos y diabéticos con osteoporosis.

6. Comparar el nivel de unión ósea radiológica, la DMO, el nivel de unión ósea histológico, y la inmunopositividad de FCEV y BMP-2 de DOTCs de la sínfisis mandibular de rata, a las 4 y 8 semanas de ser tratados con BCs + CMM-MO o BCs + CMM-BAB en animales sanos, diabéticos, osteoporóticos y diabéticos con osteoporosis

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

III.MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia (código CEEA 154/2015) (Anexo 1).

Durante el desarrollo de la investigación se precisaron diversos equipos e instrumental científico que fueron facilitados por el Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia, en las siguientes secciones:

a). Sección de Animales de Laboratorio (animalario):

- Mantenimiento de los animales de experimentación.
- Intervenciones quirúrgicas practicadas en el quirófano nº 2.
- Fármacos anestésicos y analgésicos: ketamina (Anaestamine[®], Le Vet Beheer B.V., Países Bajos), buprenorfina (Bupaq[®], Richter Farma Ag. Wells, Austria), enrofloxacin (Alsir[®], Laboratorios Dr. Esteve, Alemania), meloxicam (Metacam[®], Boehringer Ingelheim, España), Hidrocloruro de medetomidina (Dormisan[®], Fatro Ibérica, Italia), atipamezol (Tipafar[®], Fatro Ibérica, Italia), hidroxietilcelulosa (Lacriforte, Produlab Pharma, Holanda),
- Fármaco anticolinérgico: atropina sulfato (Atropina[®], Braun Medical, España).
- Agente antiséptico: povidona yodada (Betadine[®], Meda Manufacturing, Suiza).
- Cloruro de sodio (Vitulia[®], Laboratorios ERN, España).
- Campana de inhalación de CO₂.
- Material quirúrgico: jeringa metálica, agujas desechables de 25 mm de longitud, carpule de articaína con epinefrina 1:100.000 (1'8mL), mango de bisturí nº 3 y bisturí de hoja nº 15, tijeras de punta recta, periostotomos de Molt, pinzas hemostáticas, cucharillas de legrado, curetas Gracey 5/6, pinzas acodadas, mosquito y de Adson, portaagujas, hilos y aguja de sutura.
- Gasas estériles (Gaspunt[®], España).
- Biocerámica bioactiva de 3º generación bifásica (Osteosynt[®], EincoBio, Belo Horizonte, Brasil).
- Medidor de glucosa en sangre biomecánico VetScan VS1 (Abaxis[®], Griesheim, Alemania).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

- Cabina de flujo laminar Flow-Tronic.

b). Sección de Cultivo de Tejidos:

- Cabina de flujo laminar Cultair ASB II.
- Centrifugadoras, incubadoras de agitación, estufas de incubación de CO₂.
- Microscopio óptico Nikon Eclipse TE-2000U acoplado a un sistema de videofilmación y fotografía digital.
- Microscopio óptico invertido con contraste de fases Nikon Diaphot-TMD.
- Contador de células automático BIO-RAD TC10™.
- Diapositivas de recuento de doble cámara (BIO-RAD®, California, Estados Unidos).
- Placa de 48 pocillos (Nunclon™ Delta, NUNC®, Massachusetts, Estados Unidos).
- Tubos de microcentrífuga (Eppendorf®, Hamburgo, Alemania).
- Frascos de cultivo t75 y t25 (SARSTEDT AG&Co, Nümbrecht, Alemania)
- Colorante azul de tripano (BIO-RAD®, California, Estados Unidos).
- Frascos transparentes tipo duquesa (Auxilab®, Madrid, España).

c) Sección Universitaria de Microscopía.

- Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) JEOL JSM-6100.
- Software de microanálisis de elementos (EDX).
- Microscopio óptico Leica™ DMRB cámara Leica™ DC500.
- Microtomo de 3 µm.
- Tinciones de H-E y azul de toluidina.

d). Animalario del Campus de Ciencias de la Salud (situado en el complejo del HGUVA):

- Equipo bimodal de Tomografía por Emisión simple de Fotones (SPECT) y de Tomografía Axial Computarizada (CT).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Animales de experimentación

Se utilizaron un total de 96 ratas Sprague-Dawley hembras de 7 semanas de vida con un peso medio de 250 g.

3.2.2. Aislamiento, cultivo y expansión celular para obtener células madre mesenquimales de la médula ósea de rata

Tras el sacrificio de 2 animales mediante inhalación de CO₂, las CMM-MO fueron obtenidas de los ejes centrales de los cuatro fémures. La preparación y diferenciación osteogénica de las CMM-MO se realizó siguiendo la técnica de Ikeuchi de 2002 (Ikeuchi y cols., 2002).

Una vez extirpados los fémures derechos e izquierdos bajo condiciones de esterilidad (Figura 8), las epífisis proximal y distal fueron separadas de la diáfisis (Figura 9) y la médula ósea de las metáfisis fue puncionada con una jeringa de 1,5 mm de diámetro (Figura 10).



Figura 8. Fémur derecho e izquierdo de las dos ratas Sprague-Dawley.

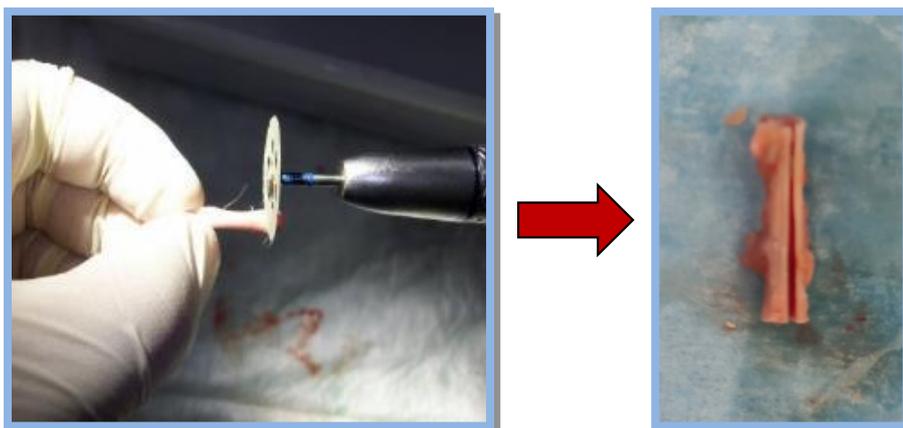


Figura 9. Eliminación de las epífisis proximal y distal mediante disco de corte de metal con pieza de mano.



Figura 10. Obtención de la médula ósea mediante punción.

8 mL de médula ósea fueron incluidos en una jeringa de 10 mL, en la que se incluyeron previamente 1 mL de citrato anticoagulante (ACD-A, Anticoagulant Citrate Dextrose Solution, Biomet Biologics), además de una mezcla de antibiótico (1mg/mL de estreptomicina y penicilina) y antifúngico (1mg/mL de fungizona) (Figura 11). Esta mezcla fue centrifugada a 600 X g durante 10 minutos (Figura 12). Entonces, una media de $3,5 \pm 0,5$ mL de BMC (fase media correspondiente al concentrado de células mononucleares) fue separado del plasma libre de células mezclado con citrato anticoagulante (fase más superior) y de las células rojas de la sangre (parte más inferior) (Figura 13) (Hamini y cols., 2014; Grassmann y cols., 2015).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

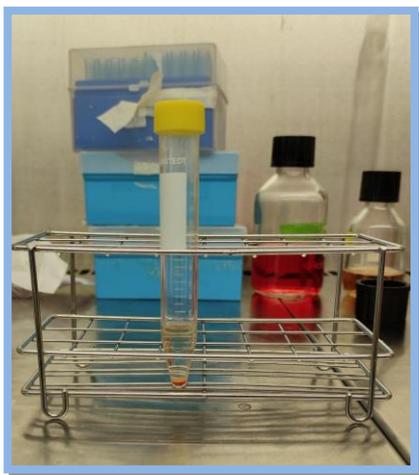


Figura 11. Tubo de ensayo con citrato sódico, antibiótico, antifúngico y 8mL de médula ósea.



Figura 12. Centrifugadora de la Sección de Cultivo de Tejidos.

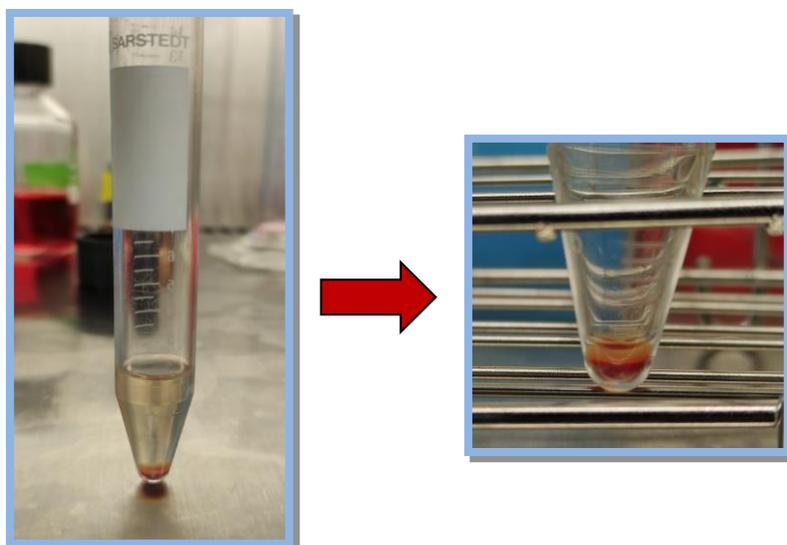


Figura 13. Tubo de ensayo con las tres fases diferenciadas de la muestra de médula ósea tras el centrifugado.

Estas células fueron lavadas y suspendidas en medio de cultivo (MEM; Nacalai Tesque Tokio, Japón) conteniendo 15% de suero bovino fetal (SBF; JHR Bioescences, KS, USA), 10 nM DEX (Sigma-Aldrich Química, S.L, Madrid, España), 10 nM β -GP (Merck, Darmstadt, Alemania), 0,28 nM de ácido asbórbico 2-fosfato magnesio sal n-hidrato (Sigma-Aldrich Química, S.L, Madrid, España) y 1% de antibiótico (100 U/ml de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina y 0,25 μ g/mL de amfotericina B) (Sigma-Aldrich Química, S.L, Madrid, España).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

Las células fueron cultivadas en frascos T-75 a una humedad atmosférica del 95%, un aire con 5% de CO₂ y una temperatura de 37 °C (Figura 14).



Figura 14. Frasco de cultivo T-75 con las CMM-MO suspendidas en el medio de cultivo DEMEM.

Las células adherentes proliferadas fueron inicialmente cultivadas hasta una confluencia del 80% durante 10 días cambiándoles el medio de cultivo cada 3 días. Los frascos de cultivo se visualizaron con el microscopio óptico a un aumento 10x. (Figuras 15- 17).



Figura 15. Microscopio óptico invertido con contraste de fases Nikon Diaphot-TMD.

Figura 16. Microscopio óptico Nikon Eclipse TE-2000U.

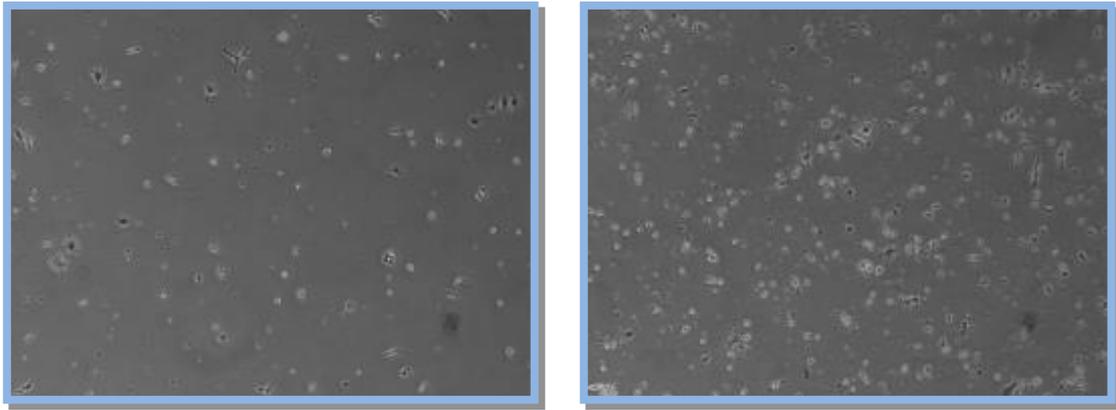


Figura 17. Apariencia de las CMM-MO en el primer día del cultivo primario.

Después de 10 días en cultivo primario, las CMM fueron liberadas de su sustrato de cultivo en los frascos T-75 usando tripsina al 0,05% y 0,53 mM de EDTA. Las células fueron centrifugadas a 900 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y resuspendidas a una concentración de 1×10^7 células/mL en MEM (Figuras 18 y 19). En este estudio, las células adherentes fueron consideradas como CMM-MO.

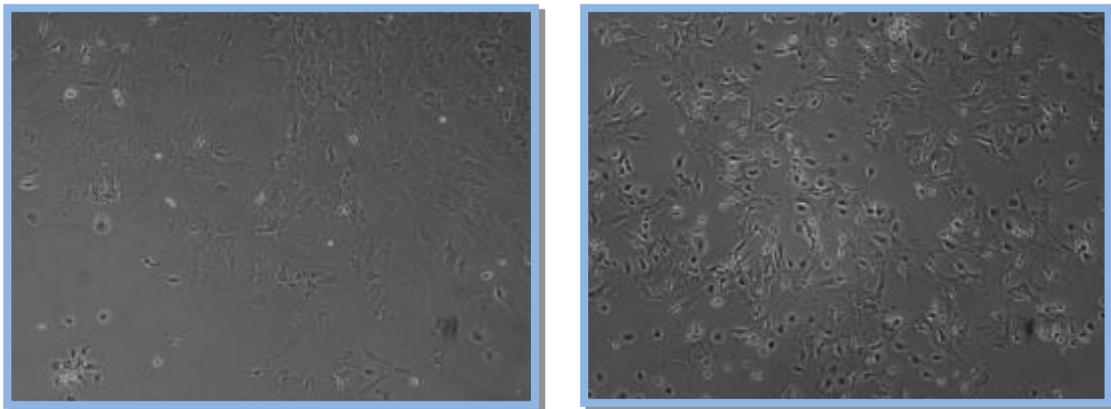


Figura 18. Apariencia de las CMM-MO en el segundo subcultivo.

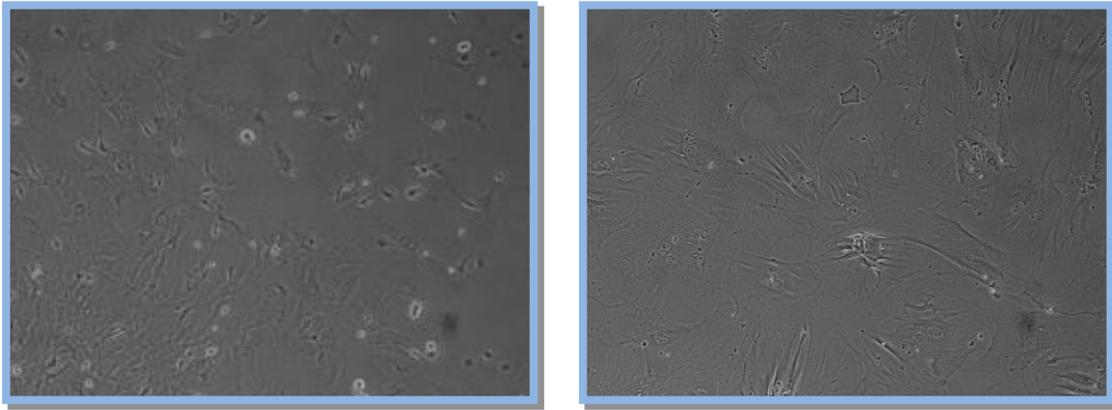


Figura 19. Apariencia de las CMM-MO en el tercer subcultivo.

3.2.3. Aislamiento, cultivo y expansión celular para obtener CMM-BAB de rata

Tras la inyección de anestesia local a dos animales, las CMM-A fueron obtenidas de cuatro bolas adiposas de Bichat (BAB). La preparación y diferenciación de las CMM del tejido adiposo se realizará siguiendo la técnica descrita por Farré-Guasch y cols. en 2010 (Farré-Guasch y cols., 2010) y por Zuk y cols. en 2002 (Zuk y cols., 2002). La extracción de las cuatro BAB se realizó por acceso extraoral. En primer lugar, se efectuó una incisión con tijeras de punta recta que abarcaba el plano cutáneo y los planos musculares subyacentes (músculos masetero y temporal). A continuación, con una pinza mosquito, se procedió a la localización de la BAB izquierda, tejido adiposo subcutáneo que se sitúa entre el borde anterior del músculo masetero y el músculo buccinador y en la profundidad del músculo temporal (Figura 20).

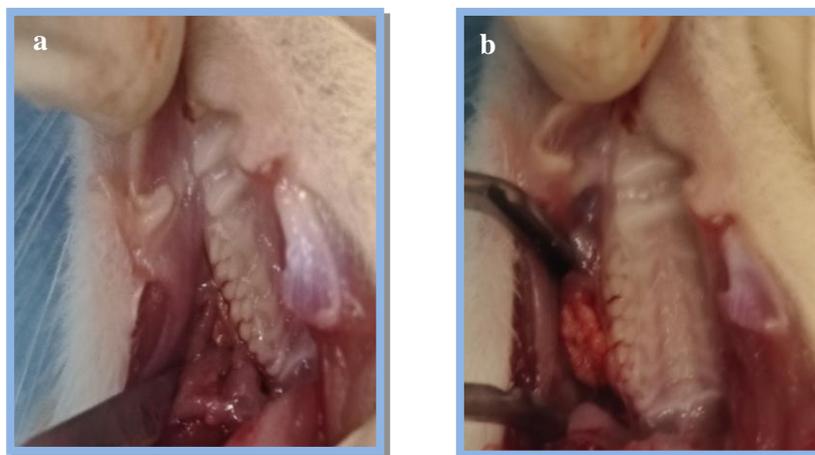


Figura 20. Incisión en la piel y el músculo masetero (a) para acceder a la bola adiposa de Bichat (b).

Una vez hallada, se procedió a su escisión mediante un corte con bisturí para liberar las fascias musculares circundantes (Figura 21). Finalmente, el tejido se irrigó con suero fisiológico Vitulia al 0'9% con el fin de eliminar las impurezas que hubiesen podido albergarse en el tejido graso durante el procedimiento de exéresis quirúrgica y se introdujo en tubos de microcentrífuga, al que se incorporó una mezcla de antibiótico (1mg/mL de estreptomicina y penicilina) y antifúngico (1mg/mL de fungizona) para su posterior tratamiento en la Sección de Cultivo de Tejido del SAI (Figura 22).

Del mismo modo se procedió a la resección de la BAB contralateral y de las del segundo animal.

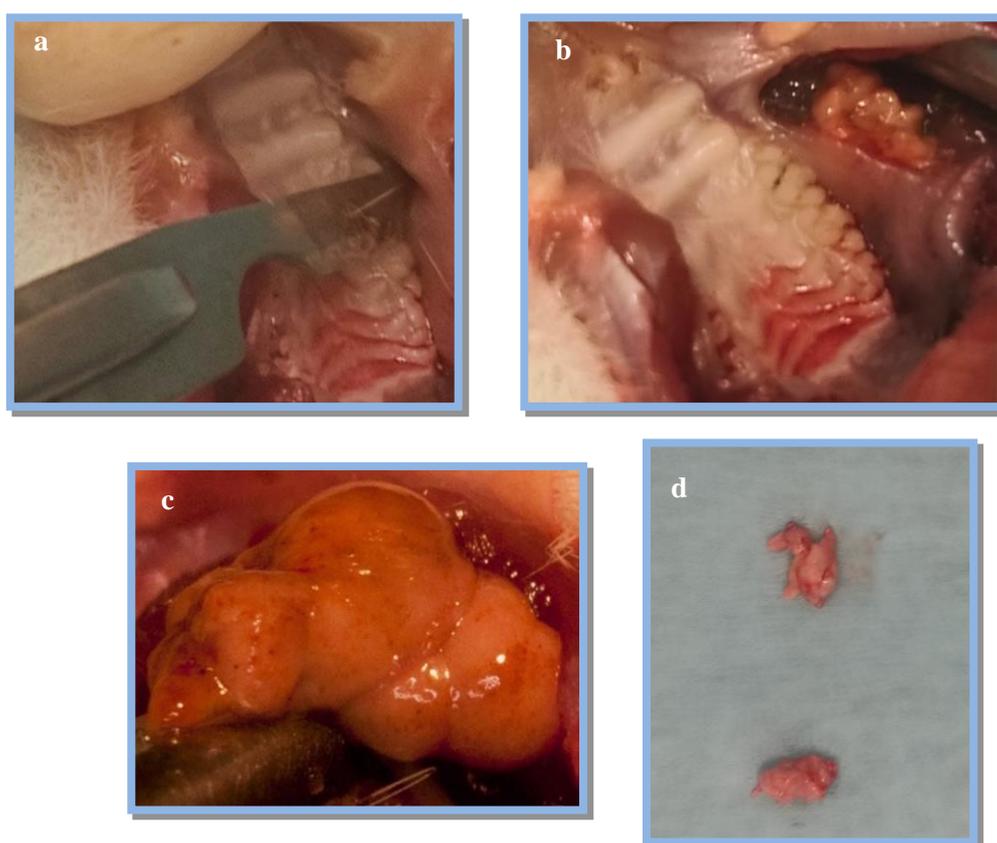


Figura 21. Localización *ex vivo* de las bolas adiposas de Bichat derecha (a) e izquierda (b) y escisión de las mismas de los espacios anatómicos que las contienen (c, d).

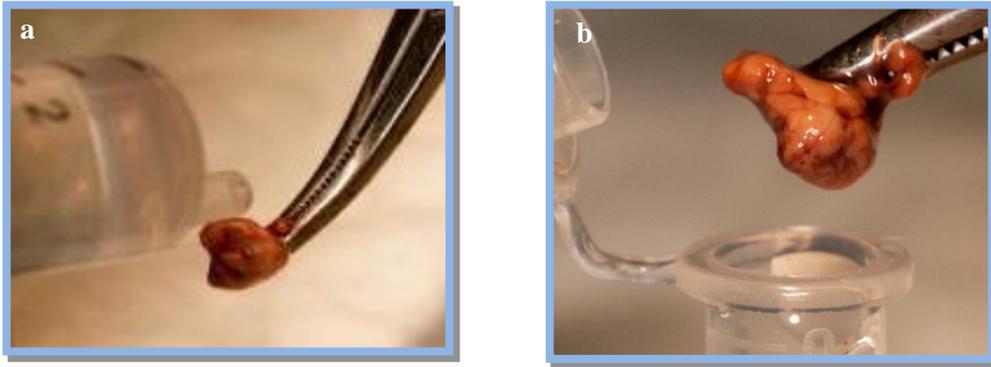


Figura 22. Limpieza del tejido graso con suero fisiológico Vitulia 0'9% (a) y almacenamiento en tubo de microcentrifuga con antibiótico y antifúngico (b).

Las BABs fueron lavadas varias veces con PBS, recortada en pequeñas piezas y tratada con 0,075% de colagenasa I (Sigma-Aldrich Química, S.L, Madrid, España), durante 60 minutos a 37°C. Después de la incubación, el tejido adiposo fue centrifugado a 400 X g durante 10 minutos para separar los adipocitos y las gotas lipídicas (grasa) de la fracción vascular estromal (FVE) (Figura 23).

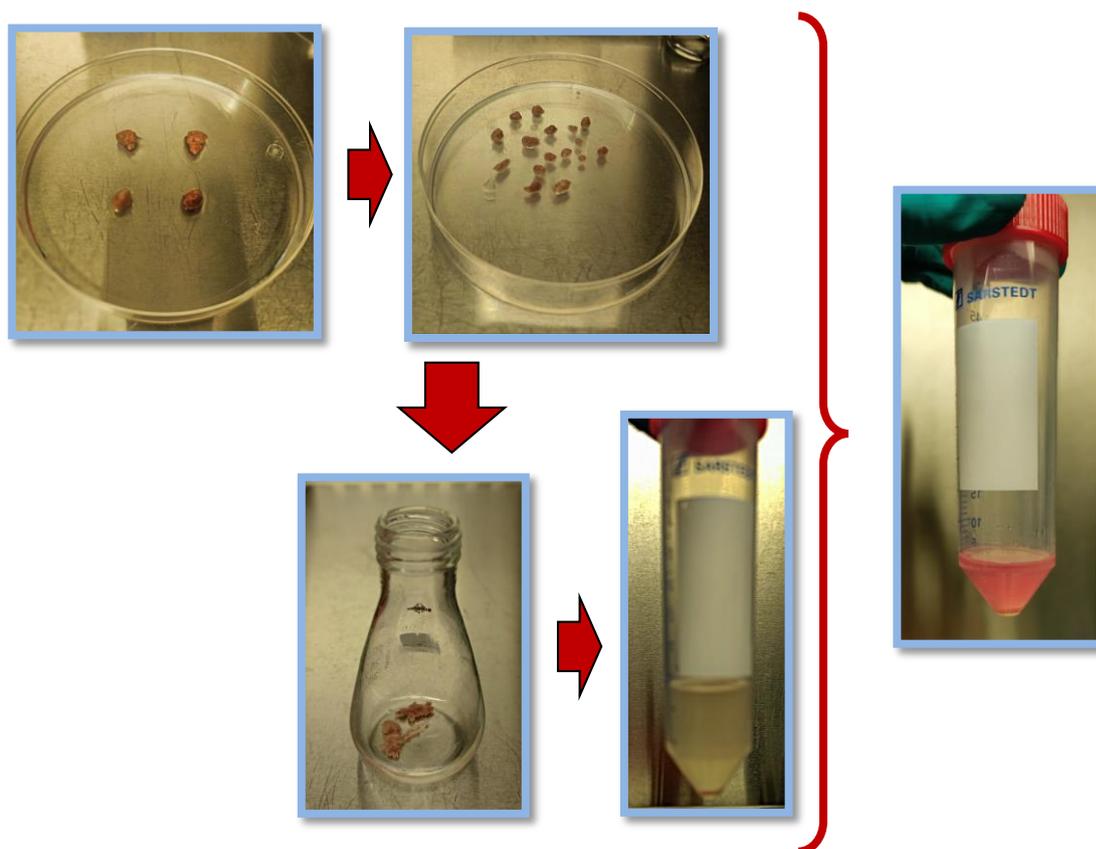


Figura 23. Proceso de obtención de las CMM-BAB según protocolo descrito por Zuk y cols. en 2002.

El concentrado celular fue resuspendido en una solución buffer para lisis de células sanguíneas (8,2 g/L de NH_4Cl , 0,84 g/L de NaHCO_3 y 0,37 g/L de ácido etilendiaminotetraacético disódico con PH 7,4) e incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células de la FVE fueron resuspendidas en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) bajo en glucosa conteniendo 10% de suero bovino fetal (SBF) y 100 unidades/mL de solución antibiótica/antimicótica. Las células suspendidas fueron pasadas a través de un filtro de células de 100 μm (BD, Biosciencias, Palo Alto, CA); las células fueron contadas y su viabilidad será medida por exclusión con azul de tripano.

Las células fueron sembradas (5×10^3 células/ cm^2) en 100 mL de botellas de cultivo y mantenidas en una estufa húmeda a 37°C y 5% de CO_2 . Después de 3-4 días, las colonias de células individuales fueron visualizadas al microscopio óptico a un aumento 10x. La población de células adheridas son referidas como pase 0 (P0) (Figura 24), así como varios pases (hasta un mes de cultivo) (Figuras 25 y 26). Después de 1 semana de

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

cultivo, las células de BAB serán contadas y el número de células por gramo será calculado.

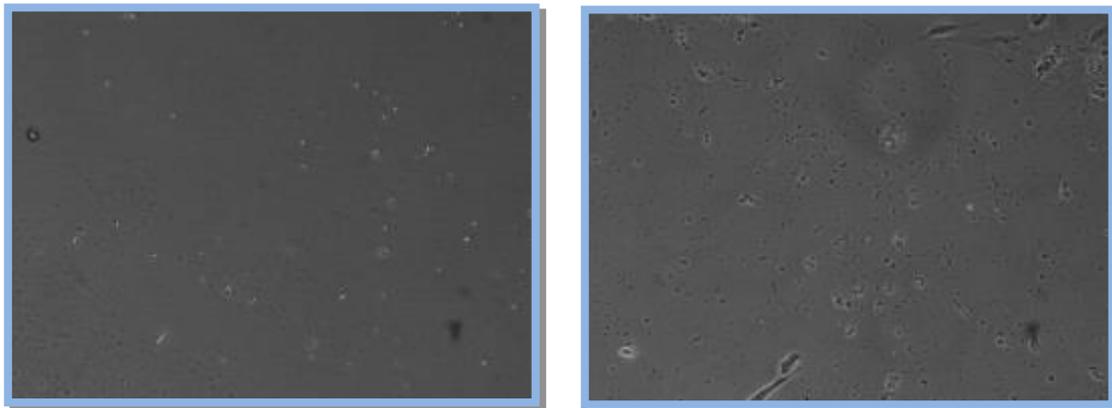


Figura 24. Apariencia de las CMM-BAB en los primeros días del cultivo primario.

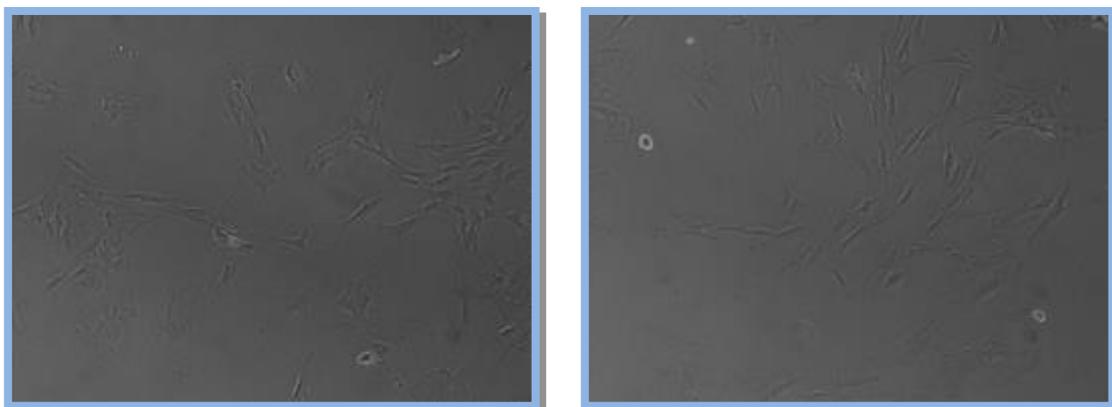


Figura 25. Apariencia de las CMM-BAB en el primer subcultivo.

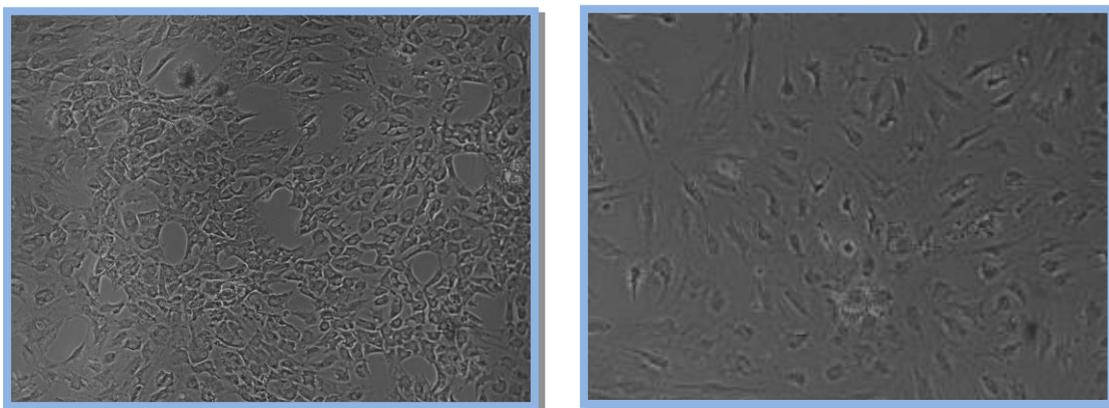


Figura 26. Apariencia de las CMM-BAB en el segundo pase.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

Las células de BAB, serán inducidas a diferenciación en medio osteogénico durante varias semanas. El medio osteogénico estaba compuesto por DMEM + SBF (10%) + 0,01 μ M, 1,25-dihideoxivitamina D3, 50 μ M de ascorbato-2-fosfato, 10 mM de β -glicerofosfato y 1% de solución antibiótica/antimicótica. En este estudio, las células adherentes al frasco de cultivo se han considerado CMM-BAB.

3.2.4. Animales de experimentación

Un total de 96 ratas Sprague-Dawley hembras de 15 semanas de vida y entre 180-280 g de peso (peso medio 250 g) han sido incluidas en el estudio. Los animales se aclimataron en las instalaciones de la Sección de Animales del Laboratorios (Servicio de Apoyo a la Investigación) durante una semana antes de comenzar el estudio, en condiciones normales de alojamiento de animales de experimentación cumpliendo las recomendaciones establecidas por el RD 53/2013 con comida y bebida disponible *ad libitum*.

3.2.5. Grupos experimentales: aleatorización de la muestra

Una vez aclimatados, los animales han sido asignados al azar en 4 grupos en este estudio controlado aleatorizado. La secuencia de aleatorización será generada usando un servicio digital online de aleatorización (www.randomization.com). Cada grupo está compuesto por un total de 24 animales (Figura 27):

- Grupo 1: sanas (n=24).
- Grupo 2: diabéticas (n=24).
- Grupo 3: osteoporóticas (n=24).
- Grupo 4: diabéticas + osteoporóticas (n=24).

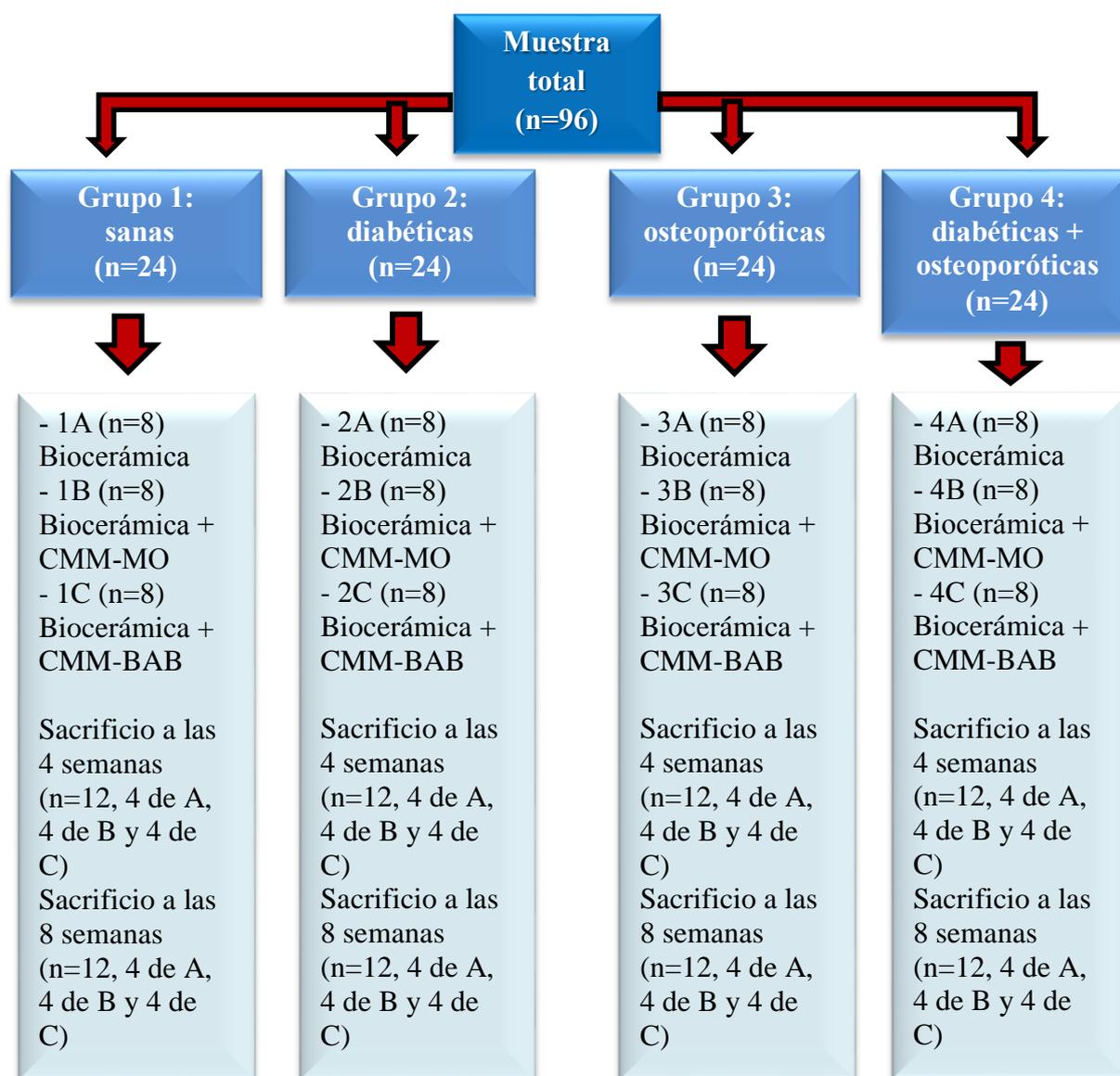


Figura 26. Aleatorización de las muestras de estudio en los 4 grupos diferentes.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

3.2.5.1. Subgrupos de tratamiento

Los 24 animales de cada uno de los 4 grupos fueron aleatorizados en 3 subgrupos:

- A (n=8): Biomaterial.
- B (n=8): Biomaterial + Osteoblastos derivados de CMM-MO.
- C (n=8): Biomaterial + Osteoblastos derivados de CMM-BAB.

A (n=8): Biomaterial

En el defecto óseo localizado en la sínfisis mandibular se colocó hidroxiapatita (60%) + β -TCP (40%) en gránulos de 425 a 850 μm (Osteosynt[®], Eincobio, Belo Horizonte, Brasil).

B (n=8): Biomaterial + Osteoblastos derivados de CMM-MO

En el defecto óseo localizado en la sínfisis mandibular se colocó hidroxiapatita (60%) + β -TCP (40%) en gránulos de 425 a 850 μm (Osteosynt[®], Eincobio, Belo Horizonte, Brasil) + osteoblastos derivados de las CMM-MO.

La biocerámica (40 mg) se colocó en uno de los 48 pocillos de una placa de polietileno, entonces añadiremos 1 mL de suspensión de células y se cultivará durante 48 horas. Nuestro estudio mostrará que aproximadamente 30% de las células añadidas a la biocerámica son viables por lo que el injerto tendrá $7,5 \times 10^5$ células por cada 10 mg de biocerámica.

C (n=8): Biomaterial + Osteoblastos derivados de CMM-BAB

En el defecto óseo localizado en la sínfisis mandibular se colocó hidroxiapatita (60%) + β -TCP (40%) en gránulos de 425 a 850 μm (Osteosynt[®], Eincobio, Belo Horizonte, Brasil) + osteoblastos derivados de CMM-BAB.

La biocerámica (40 mg) se colocó en uno de los 48 pocillos de una placa de polietileno, entonces añadimos 1 mL de suspensión de células y se cultivó durante 48 horas. Nuestro estudio mostró que aproximadamente el 30% de las células añadidas a la biocerámica son viables por lo que el injerto tuvo $7,5 \times 10^5$ células por cada 10 mg de biocerámica.

3.2.6. Inducción de diabetes mellitus en los animales de experimentación

En los animales del Grupo 2 (n=24) y Grupo 4 (n=24), la diabetes mellitus fue inducida mediante una dosis única de estreptozotocina (STZ) (45 mg/Kg por vía intraperitoneal) (Sigma-Aldrich Química, S.L, Madrid, España) disuelta en tampón citrato (Figura 45)



Figura 45. Estreptozotocina disuelta en tampón citrato.

Para comprobar la inducción efectiva de la diabetes mellitus, una muestra de sangre de la cola de cada animal (previa desinfección de la zona con alcohol al 98%) fue tomada antes de la administración de la estreptozotocina y una semana después (donde verificamos si ha habido sido efectiva antes de realizar el procedimiento quirúrgico) y finalmente, constatamos el mantenimiento de la enfermedad durante todo el trabajo de campo tomando una última muestra de sangre el mismo día del sacrificio del animal.

El nivel de glucosa en sangre se cuantificó colocando la muestra de sangre en recipientes estériles de 0,5 mL que fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos para extraer el plasma. El plasma fue inmediatamente analizado mediante el analizador biomecánico VetScan VS1 (Abaxis®, Griesheim, Alemania).

Los animales fueron considerados diabéticos si los niveles de glucosa en sangre eran mayor a 200 mg/dl (Figura 46).

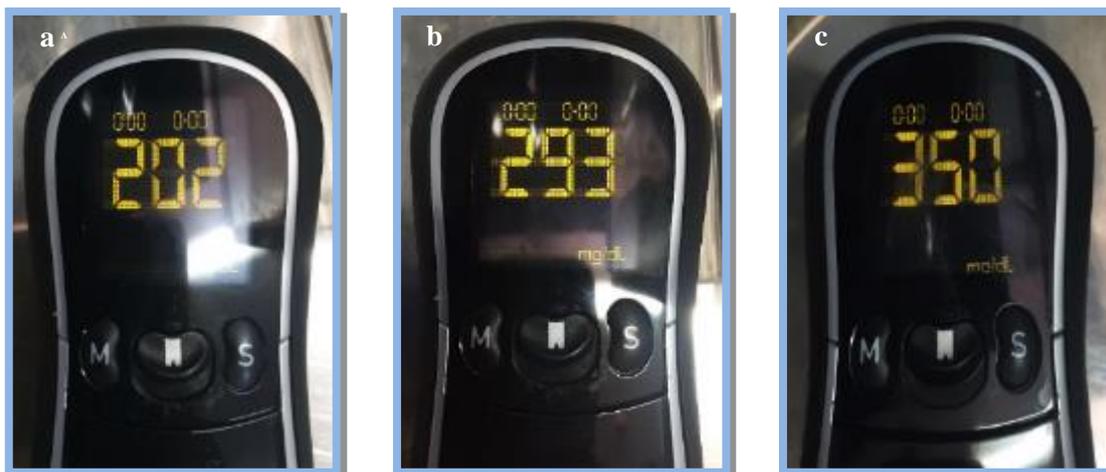


Figura 46. Distintas muestras de niveles de glucosa en sangre que certifican la inducción de diabetes mellitus (>200mg/dl) en tres animales de experimentación, según el analizador biomecánico VetScan1 VS1 (a, b, c).

3.2.7. Inducción de osteoporosis en los animales de experimentación

En los animales del Grupo 3 (n=24) y Grupo 4 (n=24) aplicamos un modelo de osteoporosis mediante ovariectomías bilaterales.

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (10 gr/100 ml) (Ketamidor[®], Richter Farma Ag. Wells. Austria) y xilacina (2%) al 50% (0,1 mL/100 gr de peso) (Xilagesic[®], Laboratorios Calier SA. Les Franqueses del Valles. España) por vía intraperitoneal (40-90 mg/kg ketamina + 5-10 mg/kg xilacina). Previamente a la cirugía, se suministró a los animales una correcta analgesia con buprenorfina (0,05 mg/kg por vía subcutánea) (Bupaq[®], Richter Farma Ag. Wells. Austria). A nivel local, se administró anestesia local mediante lidocaína en spray. La región abdominal fue rasurada,



Figura 47. Región abdominal rasurada.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

lavada con suero fisiológico y cubierta con una solución de povidona yodada al 10% (Figura 47).

Realizamos una incisión dorsal de 5 mm de longitud en el flanco derecho e izquierdo de cada rata, entre la parte inferior de la caja torácica y la parte delantera de las extremidades traseras. Se realizó un corte en uno de estos flancos con una tijera quirúrgica en una zona un centímetro anterior a la pata posterior del animal y un par de centímetros lateral al centro del vientre. En primer lugar, se secciona la piel y la capa adiposa bajo la misma, a continuación, la capa muscular que rodea la cavidad peritoneal teniendo cuidado de no perder los bordes de dicha capa utilizando “pinzas mosquito” (Figura 48). Por el orificio practicado se introdujeron unas pinzas pequeñas con el fin de localizar la trompa de Falopio (conducto largo y estrecho de color rosa pálido que suele estar adherido a masas adiposas) y se tiró de ésta hacia arriba con cuidado. Se siguió su recorrido hasta dar con el ovario. Por debajo del ovario se hizo un nudo con hilo quirúrgico con el objetivo de ligar la arteria ovárica y, acto seguido, se extirpó el ovario por encima de la ligadura (Figuras 49 y 50). Una vez finalizó esta operación, se introdujeron las vísceras restantes de nuevo en la cavidad peritoneal, se suturó con sutura reabsorbible la capa muscular y, a continuación, se suturó la piel. A continuación, se procedió a repetir la operación con el ovario contralateral (Figura 51). Después de realizar las ovariectomías bilaterales, las trompas de Falopio fueron ligadas con sutura reabsorbible de 3-0 (Vicryl[®], Ethicon

GmbH, Norderstedt, Alemania). Finalmente, la piel se suturó con sutura no reabsorbible de 3-0 (Prolene; Johnson and Johnson, Nordested, Alemania) (Figura 52).

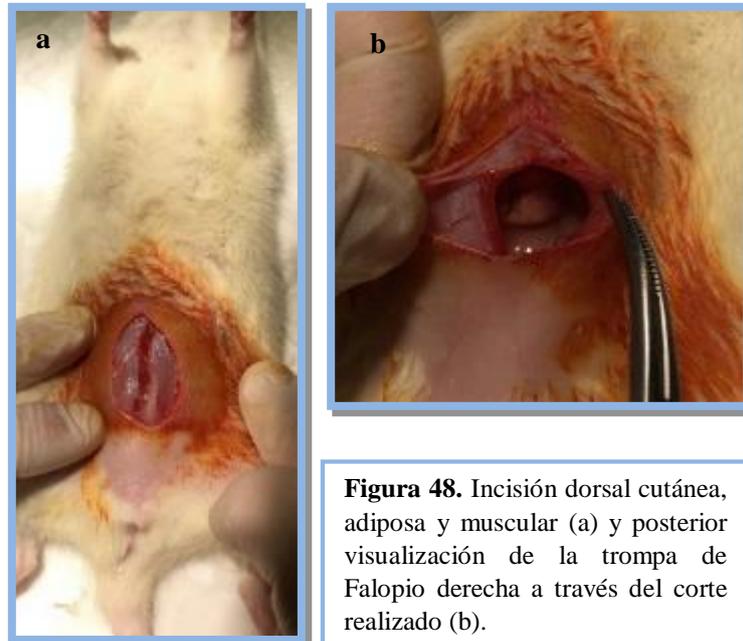


Figura 48. Incisión dorsal cutánea, adiposa y muscular (a) y posterior visualización de la trompa de Falopio derecha a través del corte realizado (b).

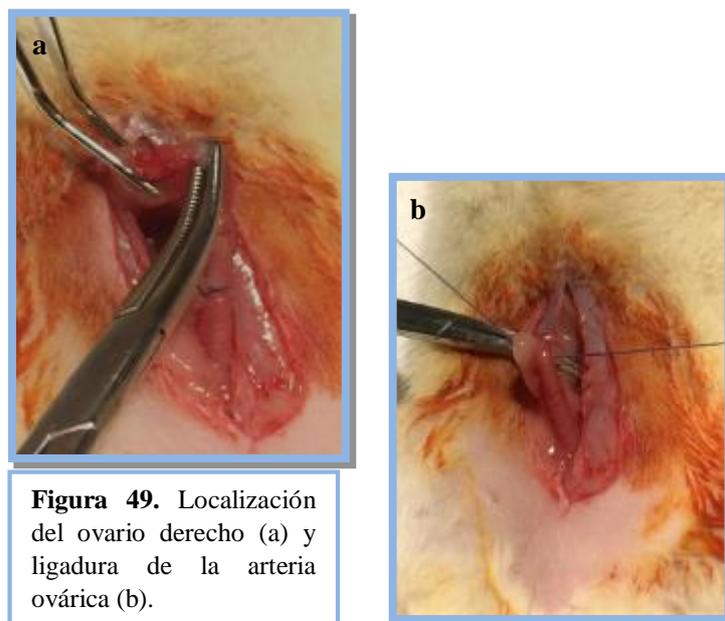


Figura 49. Localización del ovario derecho (a) y ligadura de la arteria ovárica (b).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

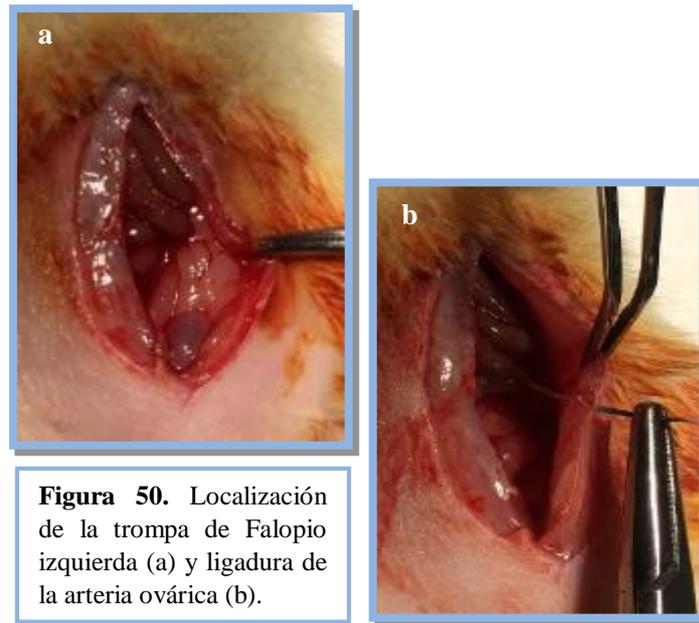


Figura 50. Localización de la trompa de Falopio izquierda (a) y ligadura de la arteria ovárica (b).



Figura 51. Escisión del ovario derecho e izquierdo.



Figura 52. Sutura continua de la incisión quirúrgica.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

Los defectos óseos se realizaron 6 semanas después de que las ratas fuesen ovariectomizadas.

3.2.8. Procedimiento quirúrgico

Este procedimiento es el mismo para el total de la muestra (n=96). Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (10 gr/100 ml) (Ketamidor[®], Richter Farma Ag. Wells. Austria) y xilacina (2%) al 50% (0,1 mL/100 gr de peso) (Xilagesic[®], Laboratorios Calier SA. Les Franqueses del Valles. España) por vía intraperitoneal (40-90 mg/kg ketamina + 5-10 mg/kg xilacina). Previamente a la cirugía, se administró a los animales una correcta analgesia con buprenorfina (0,05 mg/kg por vía subcutánea) (Bupaq[®], Richter Farma Ag. Wells. Austria) (Figura 27). A nivel local, se administró anestesia local mediante lidocaína en spray.



Figura 27. Fármacos utilizados para la anestesia y analgesia de los animales de experimentación.

La región submandibular fue rasurada, lavada con suero fisiológico y cubierta con una solución de povidona yodada al 10% (Figura 28). Se realizó una incisión de 10 mm de longitud (semilunar y divergente hacia caudal) sobre el margen inferior de la mandíbula. La piel fue completamente retirada craneal y caudalmente para dejar expuesto el periostio. Se realizó una incisión adicional en el periostio sobre cada uno de los lados de la sínfisis mandibular con el objetivo de exponerla (Figuras 29, 30). El periostio fue elevado y el tejido fibroso que ocupa la sínfisis mandibular fue cureteado con una cureta Gracey 5/6 para crear el defecto óseo (Figura 31). Se estima que la dimensión media del

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

defecto óseo para una rata Sprague-Dawley hembra adulta de 180-280 g de peso (peso medio 250 g) con 15 semanas de vida es de 4 X 2 mm.



Figura 28. Región submandibular rasurada y lavada con suero fisiológico y povidona yodada al 10%.



Figura 29. Incisión semilunar sobre el sobre el margen inferior de la mandíbula. Primer corte sobre plano cutáneo (a, b), con el fin de exponer el periostio (c) para luego, mediante incisiones adicionales, descubrir la sínfisis mandibular (d).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

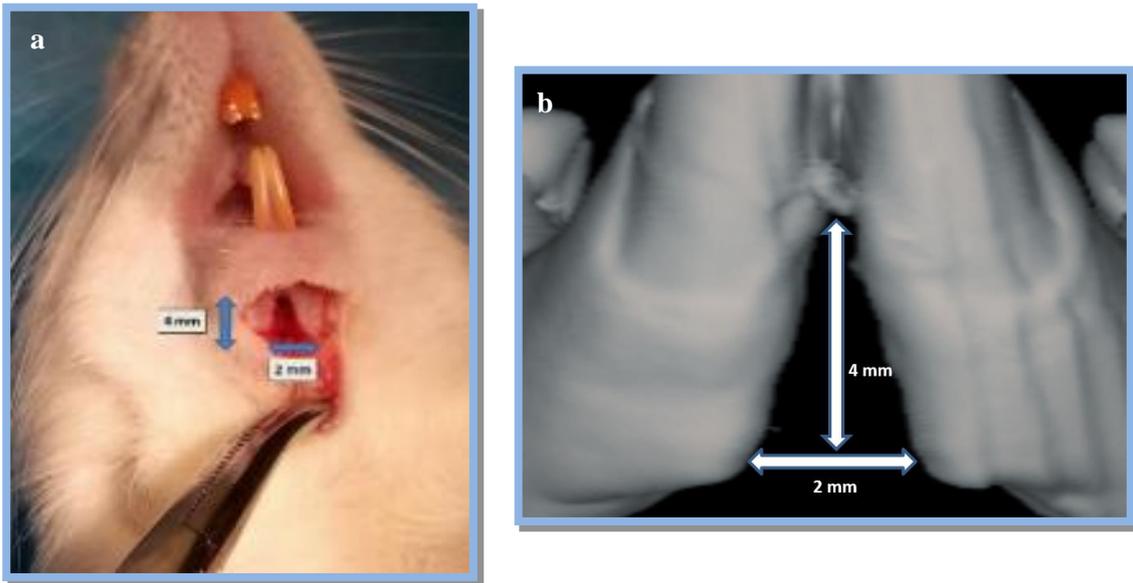


Figura 30. Defecto óseo en la sínfisis mandibular de dimensiones 4 X 2 mm tras procedimiento quirúrgico (a) y radiográfico (b).

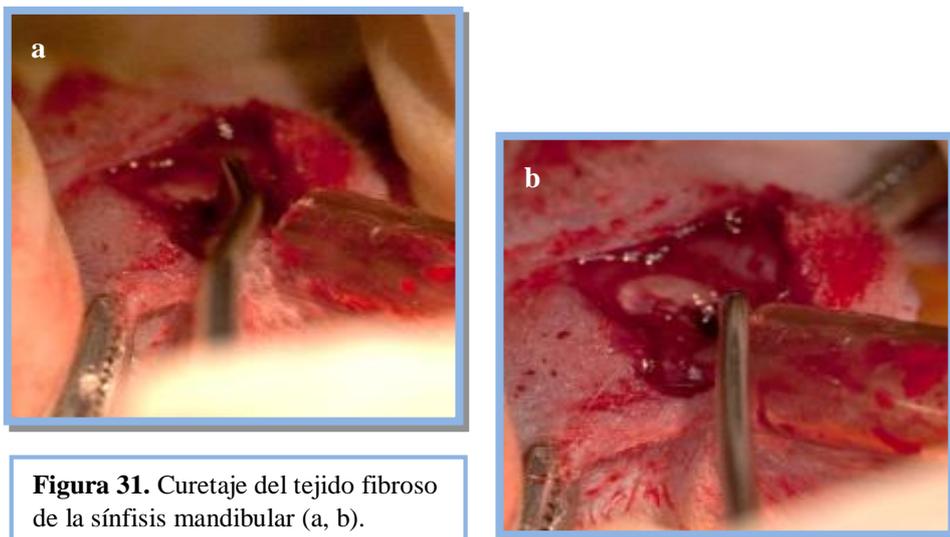


Figura 31. Curetaje del tejido fibroso de la sínfisis mandibular (a, b).

Sobre el defecto óseo creado se colocó la cerámica bifásica en las treinta y dos ratas pertenecientes a los cuatro grupos sanos (1A, 2A, 3A y 4A), mientras que en las treinta y dos ratas pertenecientes al grupo 1B, 2B, 3C y 4C la lesión ósea se rellenó con biocerámica y con osteoblastos derivados de las CMM-MO y los defectos óseos de las 32 ratas restantes (1C, 2C, 3C y 4C) se rellenó con osteoblastos derivados de la CMM-BAB (Figuras 32 - 39).



Figura 32. Biocerámica bifásica (Osteosynt® 0'5) compuesta por HA (60%) y β -TCP (40%).



Figura 33. Hidratación de la biocerámica con suero fisiológico al 0'9%.



Figura 34. Colocación del biomaterial bifásico con la ayuda del periostotomo de Molt (a) sobre el defecto quirúrgico (b).



Figura 35. Gránulos de biocerámica embebidos con suero fisiológico Vitulia 0'9%.

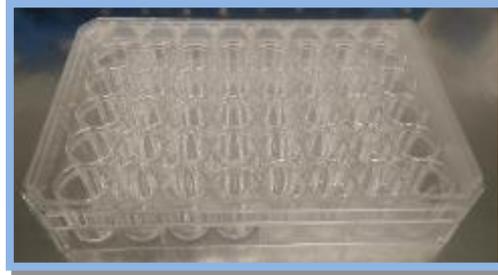


Figura 36. Placa de cuarenta y ocho pocillos después de retirar el envoltorio que la mantiene en condición estéril.

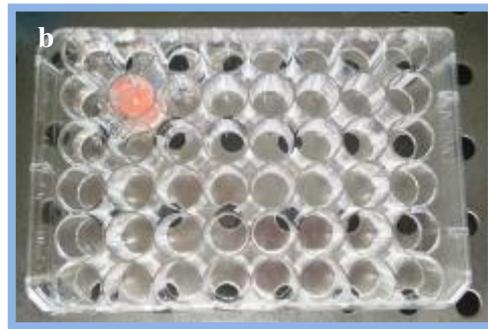
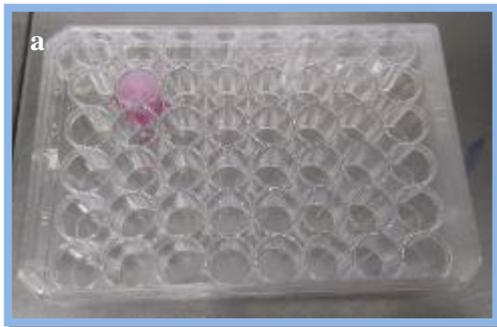


Figura 37. Fotografías de la colocación de la biocerámica bifásica y de los osteoblastos derivados de las CMM-MO/CMM-BAB en la placa de 48 pocillos en la cabina de flujo laminar; a las 24 horas (a) y a las 48 horas (b).



Figura 38. Implantación (a, b) y compactación (c) de la cerámica bifásica junto con los osteoblastos derivados de las CMM-MO/CMM-BAB en el defecto creado en la sínfisis mandibular.

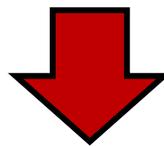
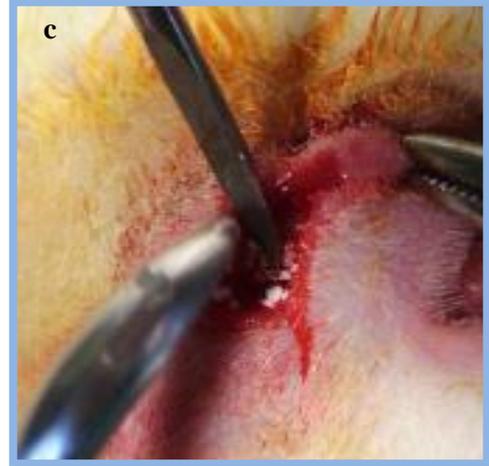
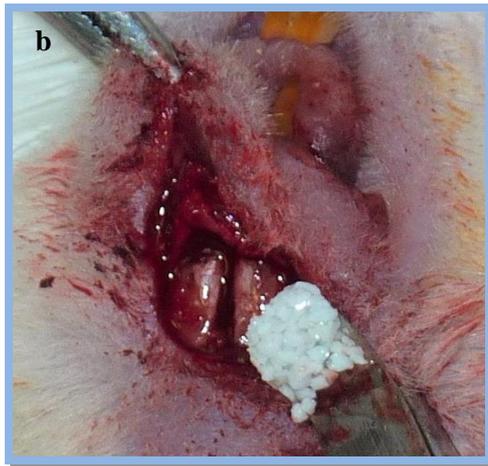


Figura 39. Biocerámica y osteoblastos derivados de las células madre mesenquimales implantados en el defecto óseo mandibular (a), para lo cual se utilizó una mesa quirúrgica veterinaria (b).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

Tras realizar la regeneración ósea en cada uno de los grupos y subgrupos de estudio, el periostio y la piel se suturaron separadamente, de manera que la lesión quirúrgica cicatrizó por primera intención. El primero se suturó con sutura reabsorbible con poliglactina 910 de 3-0 (Vicryl®, Ethicon GmbH, Norderstedt, Alemania) (Figuras 40, 41) mientras que para la sutura de la piel se utilizó sutura no reabsorbible con polipropileno de 3-0 (Prolene; Johnson and Johnson, Nordested, Alemania) (Figuras 42, 43). Finalmente, se comprobó si el espacio comprendido entre el labio y la arcada dentaria inferior presentaba algún desgarro de la mucosa oral que originase una comunicación entre el lecho quirúrgico y la cavidad bucal (Figura 44).

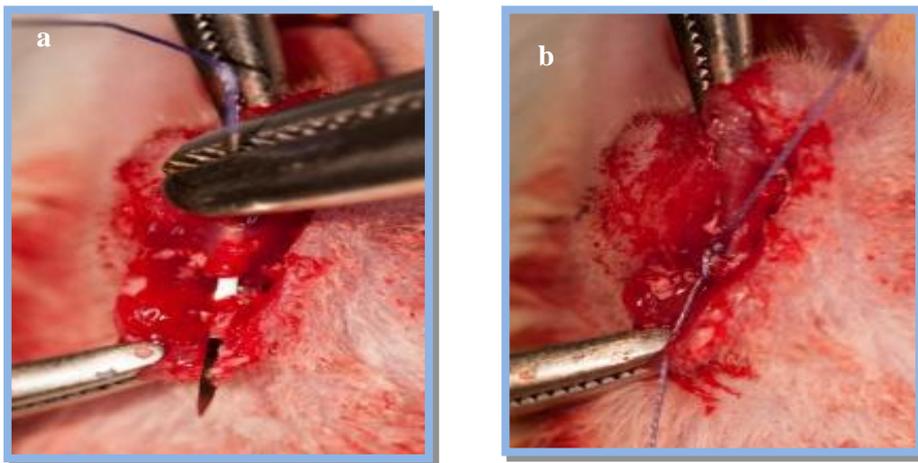


Figura 40. Cierre del periostio mediante puntos simples con sutura reabsorbible (a, b, c).



Figura 41. Aproximación de los bordes de la herida para verificar el cierre sin tensión de la piel.



Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis



Figura 42. Sutura de la piel con sutura no reabsorbible.



Figura 43. Cierre de la herida quirúrgica sin tensión, espacios muertos ni bordes evertidos.



Figura 44. Revisión del espacio vestibular anteroinferior por posible desgarro de la mucosa oral.

3.2.9. Sacrificio de los animales de experimentación

Se realizarán mediante inhalación con CO₂ y punción intracardíaca mediante sobredosis anestésica con triple dosis de pentobarbital sódico (150mg/kg).

- 4 semanas (n=48).
- 8 semanas (n=48).

3.2.10. Variables de estudio.

- Análisis radiológico
- Análisis histológico

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

- Análisis inmunohistoquímico

3.2.10.1. Micro-CT

Las muestras de mandíbulas de rata fueron analizadas usando un micro-CT Skyscan 1172 (Bruker[®], Konitch, Belgium) y un escáner trimodal SPECT/PET/CT Albira (Bruker[®], Massachusetts, USA).

En el micro-CT Skyscan 1172 (Bruker[®], Konitch, Belgium) se usaron los siguientes parámetros: voltaje de 50 kv, amperaje de 200 μ A, las muestras fueron rotadas 180° y cada mandíbula fue escaneada a intervalos de 10 μ m. Se utilizó un filtro de aluminio. Se empleó el software NRecon para reconstruir las imágenes de proyección de rayos X obtenidas durante el escaneo. Las secciones obtenidas fueron procesadas con los programas CTAn y Data Viewer (Bruker[®], Konitch, Belgium). El software CTVox (Bruker, Konitch, Belgium) se usó para generar los modelos en 3D de las muestras escaneadas.

Las imágenes en 3D obtenidas por el micro-CT Skyscan 1172 (Bruker[®], Konitch, Belgium) fueron usadas para el estudio radiológico de la unión de la sínfisis mandibular. Las imágenes fueron evaluadas empleando la escala radiológica propuesta por Yagyuu y cols (Yagyuu T y cols, 2015): puntuación 0 (no apreciación de formación de hueso nuevo), puntuación 1 (engrosamiento de la cortical ósea a lo largo de los márgenes de la sínfisis mandibular), puntuación 2 (unión ósea con aparentes grietas/fisuras), puntuación 3 (unión ósea con o sin vestigio de grietas/fisuras) (Tabla 1).

Sólo las imágenes obtenidas con el escáner trimodal SPECT/PET/CT Albira (Bruker®, Massachusetts, USA) fueron usadas para el estudio de la densidad mineral ósea (DMO). La DMO se cuantificó en la línea media de la sínfisis mandibular en unidades Hounsfield (UH), utilizando un software examinador de datos (AMIDE, UCLA, University, LA, USA). Para ello, se seleccionaron cuatro regiones de interés (ROIs) para cada muestra con cajas de 1 mm³ de volumen situadas en la línea media de la sínfisis mandibular, calculando la media de los cuatro ROIs (Camacho-Alonso F y cols, 2018; Camacho-Alonso F y cols, 2020).

| Puntuación | Descripción |
|------------|--|
| 0 | Formación de nuevo hueso no apreciable |
| 1 | Engrosamiento de hueso cortical a lo largo de los márgenes de la sínfisis mandibular |
| 2 | Unión ósea con evidencia de grietas/fisuras |
| 3 | Unión ósea con o sin vestigio de grietas/fisuras |

Tabla 1. Escala de unión radiológica.

3.2.10.2. Análisis histológico

Después del análisis radiológico, todas las mandíbulas (n=96) fueron fijadas en una solución de formalina tamponada al 10% durante 72 horas. Las mandíbulas fijadas fueron lavadas en agua destilada durante 5 minutos y luego inmersas en una solución de descalcificación de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10%(p/v)/solución de PBS pH 7,4 a 25°C. Todas las muestras permanecieron inmersas en la solución de descalcificación durante 10-12 días, agitándolas suavemente todo el tiempo y cambiando el EDTA cada 3 días. Después de la inclusión en parafina, se cortaron secciones coronales de 5 µm. Se utilizó hematoxilina y eosina (H-E) para revelar el detalle celular y azul de

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

toluidina (TBO) para teñir el hueso mineralizado. Las secciones histológicas fueron evaluadas usando la escala original referida por Salkeld y cols (Salkeld SL y cols, 2001) y modificada por Yagyuu y cols (Yagyuu T y cols, 2015): puntuación 0 (unión fibrosa con rastro de nuevo cartílago/formación ósea), puntuación 1 (unión fibrosa con algunas áreas de nuevo cartílago/hueso), puntuación 2 (unión ósea con áreas cartilaginosas) y puntuación 3 (unión ósea sin rastro de áreas cartilaginosas) (Tabla 2).

| Puntuación | Descripción |
|------------|---|
| 0 | Unión fibrosa con rastro de nuevo cartílago/formación ósea |
| 1 | Unión fibrosa con algunas áreas de nuevo cartílago/áreas de hueso |
| 2 | Unión ósea con áreas cartilaginosas |
| 3 | Unión ósea completa sin áreas cartilaginosas |

Tabla 2. Escala de unión histológica.

3.2.10.3. Análisis inmunohistoquímico

La detección de FCEV y BMP-2 se realizó usando dos anticuerpos policlonales desarrollados en conejos (ThermoFisher Scientific) y el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC). Después de un proceso de rehidratación, las secciones fueron lavadas con solución salina tamponada con Tris (TBS, 0.05 M, pH 7.6), tratadas con H₂O₂ al 0.5% en metanol durante 20 minutos, lavadas en TBS y pretratadas con suero de cerdo normal (Dako, Carpinteria, California, USA). Se diluyó 1 en 100 en TBS para bloquear los sitios de unión no específicas durante 20 minutos. Las secciones se incubaron con los anticuerpos FCEV o BMP-2 diluidos 1 en 50 durante 60 minutos, lavados en TBS e incubados durante 20 minutos con un anticuerpo IgG anti-conejo porcino biotilado (Dako, Carpinteria, California, USA), diluido 1 en 250. Finalmente, los portaobjetos se lavaron en TBS y se incubaron con el reagente ABC (Vector Laboratories, Burlingame,

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

California, USA) durante 20 minutos. La expresión fue detectada mediante incubación con el líquido DAB + sistema sustrato-cromógeno (Dako, Carpintería, California, USA); la reacción fue detenida después de 5 minutos aclarando los portaobjetos con agua del grifo. A continuación, dichos portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 2 minutos, aclarando con agua del grifo y se cubrieron con un cubreobjetos. La reacción positiva fue identificada por un precipitado de color marrón oscuro. Finalmente, la expresión de FCEV y BMP-2 fue evaluada por un análisis semicuantitativo usando una escala de 0 a 3: puntuación 0 (negativo), puntuación 1 (leve), puntuación 2 (moderado) y puntuación 3 (fuerte) (Tabla 3).

| Puntuación | Descripción |
|------------|-----------------------------------|
| 0 | No expresión de FCEV/BMP-2 |
| 1 | Expresión leve de FCEV/BMP-2 |
| 2 | Expresión moderada de FCEV/BMP-2 |
| 3 | Expresión relevante de FCEV/BMP-2 |

Tabla 3. Escala de expresión inmunohistoquímica de FCEV/BMP-2.

3.2.11. Tratamiento estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 20.0 (SPSS® Inc., Chicago, IL, USA). Se realizó un estudio descriptivo para cada variable. Igualmente, se aplicó la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y la prueba de homogeneidad de varianza de Levene y los datos obtenidos mostraron una distribución asimétrica por lo que los datos se analizaron utilizando una prueba de clasificación no paramétrica. Asimismo, se evaluaron los datos semicuantitativos (unión ósea radiológica, unión ósea histológica y análisis inmunohistoquímico) y cuantitativos (DMO) mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se aceptó una significancia estadística para $p \leq 0.05$.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

IV.RESULTADOS

4. RESULTADOS

En esta investigación todos los animales sobrevivieron hasta el final del estudio.

4.1. ANÁLISIS POR MICRO-CT (UNIÓN ÓSEA RADIOLÓGICA Y DMO)

4.1.1. Resultados de la regeneración ósea empleando CMM-MO

En todos los grupos de estudio (grupo 1 sanas, grupo 2 diabéticas, grupo 3 osteoporóticas y grupo 4 diabéticas-osteoporóticas), el análisis radiológico mediante micro-CT indica una puntuación más alta en la unión ósea radiológica obtenida mediante el tratamiento de biocerámicas bifásicas y células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea que en aquellos grupos tratados únicamente con biocerámicas con diferencias estadísticamente significativas tanto para aquellos que han sido evaluados tanto a las 4 semanas después de la cirugía (grupo 1 $p=0.011$, grupo 2 $p=0.032$, grupo 3 $p=0.032$ y grupo 4 $p=0.011$) como a las 8 semanas postoperatorias (grupo 1 $p=0.011$; grupo 2 $p=0.017$; grupo 3 $p=0.017$ y grupo 4 $p=0.011$) (Tabla 4) (Figura 53).

Del mismo modo, la mayor calificación en DMO la obtuvieron todos los grupos de estudio que fueron operados con BCs + CMM-MO que en aquellos que fueron intervenidos con BCs con diferencias estadísticamente significativas en los subgrupos sacrificados a las 4 semanas (grupo 1 $p=0.021$, grupo 2 $p=0.021$, grupo 3 $p=0.021$ y grupo 4 $p=0.021$) y a las 8 semanas (grupo 1 $p=0.021$, grupo 2 $p=0.021$, grupo 3 $p=0.021$ y grupo 4 $p=0.021$) (Tabla 5).

| ESCALA DE UNIÓN RADIOLOGICA A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | |
|---|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) |
| 0 | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) |
| 1 | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 1 (25) | 1 (25) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) |
| 2 | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) |
| 3 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 1.00 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 0.00 (0.00-1.00) | 1.50 (1.00-2.00) | 0.00 (0.00-0.00) | 1.00 (1.00-2.00) |
| p-valor | 0.011 | | 0.032 | | 0.032 | | 0.011 | |

| ESCALA DE UNIÓN RADIOLOGICA A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | |
|---|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) |
| 1 | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) |
| 2 | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 4 (100) |
| 3 | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 1.00 (1.00-1.00) | 3.00 (2.00-3.00) | 1.00 (0.00-1.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 0.00 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-2.00) |
| p-valor | 0.011 | | 0.017 | | 0.017 | | 0.011 | |

Tabla 4. Resultados de la escala de unión radiológica (Prueba U de Mann-Whitney).

| DMO A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) | BCs + CMM-MO (n=4) | BCs (n=4) | BCs + CMM-MO (n=4) | BCs (n=4) | BCs + CMM-MO (n=4) | BCs (n=4) | BCs + CMM-MO (n=4) |
| Mediana (rango) | 261.34 (238.46-273.48) | 443.24 (436.29-455.57) | 215.56 (196.14-221.38) | 356.19 (336.57-368.21) | 101.51 (95.59-106.36) | 212.66 (205.45-223.93) | 95.29 (89.24-102.78) | 206.73 (195.48-215.11) |
| p-valor | 0.021 | | 0.021 | | 0.021 | | 0.021 | |

| DMO A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) | BCs + CMM-MO (n=4) | BCs (n=4) | BCs + CMM-MO (n=4) | BCs (n=4) | BCs + CMM-MO (n=4) | BCs (n=4) | BCs + CMM-MO (n=4) |
| Mediana (rango) | 493.48 (476.29-502.35) | 764.41 (750.12-781.32) | 387.56 (366.12-395.24) | 619.31 (603.78-632.45) | 223.49 (209.79-225.29) | 414.57 (405.28-420.16) | 218.87 (200.24-223.78) | 390.23 (282.14-400.15) |
| p-valor | 0.021 | | 0.021 | | 0.021 | | 0.021 | |

Tabla 5. Resultados de la densidad mineral ósea (DMO) en unidades Hounsfield (UH) (Prueba U de Mann-Whitney).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

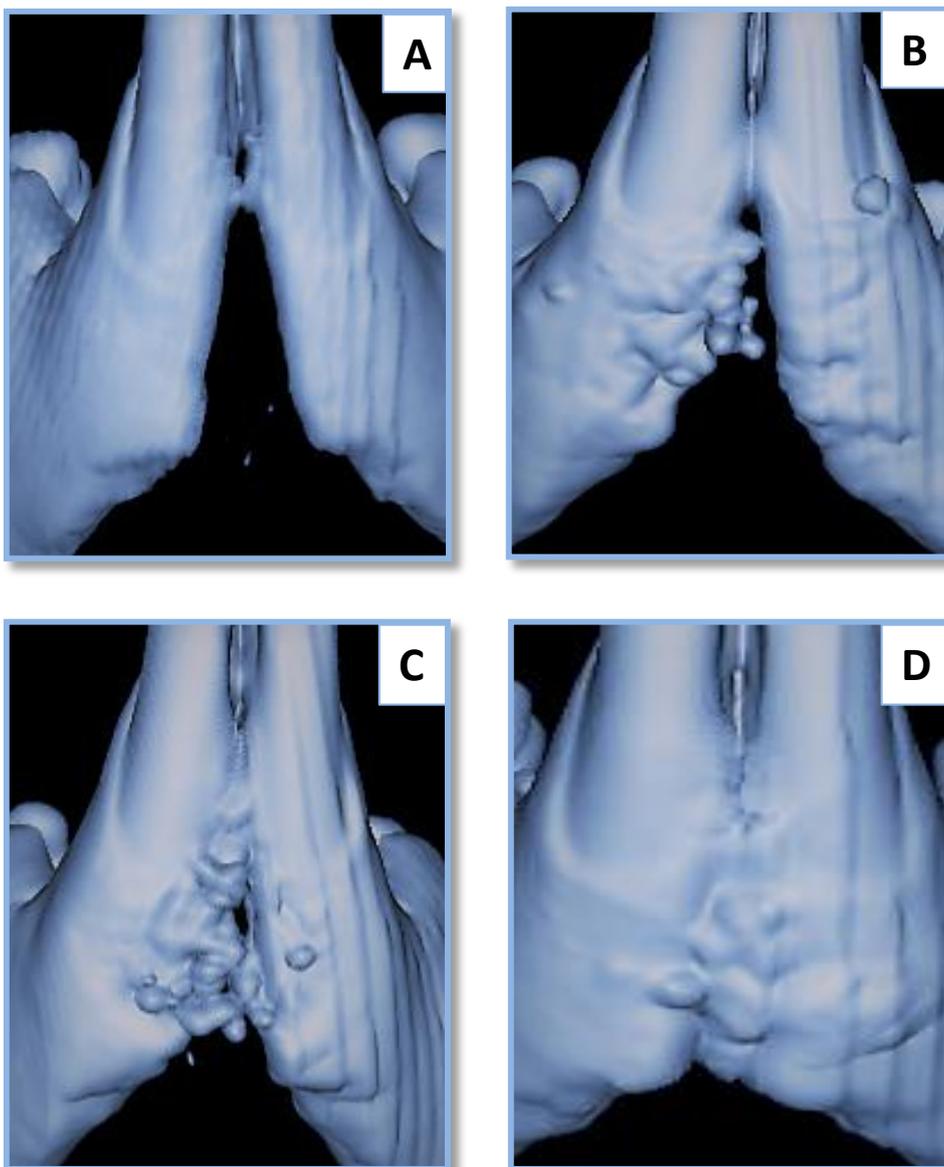


Figura 53. Análisis por micro-CT. A: Puntuación 0 (ausencia de formación ósea), después de la cirugía del grupo diabéticas + osteoporóticas (BCs/8 semanas). B: Puntuación 1 (engrosamiento de la cortical a lo largo de la sínfisis mandibular) en el grupo grupo osteoporóticas (BCs/8 semanas).C: Puntuación 2 (unión ósea con aparentes grietas/fisuras) en el grupo diabéticas (BCs + CMM-MO/8 semanas). D: Puntuación 3 (unión ósea con o sin rastro de grietas/fisuras) obtenida en el grupo sanas (BCs + CMM-MO/8 semanas).

4.1.2. Resultados de la regeneración ósea empleando CMM-BAB

En todos los grupos de estudio (grupo 1 sanas, grupo 2 diabéticas, grupo 3 osteoporóticas y grupo 4 diabéticas-osteoporóticas), el análisis radiológico mediante micro-CT muestra una mayor puntuación en la unión ósea radiológica obtenida mediante el tratamiento de biocerámicas bifásicas y células madre mesenquimales derivadas de la bola adiposa de Bichat (BCs + CMM-BAB) que en aquellos grupos tratados únicamente con biocerámicas con diferencias estadísticamente significativas tanto para aquellos que han sido evaluados tanto a las 4 semanas después de la cirugía (grupo 1 $p=0.015$, grupo 2 $p=0.013$, grupo 3 $p=0.022$ y grupo 4 $p=0.013$) como a las 8 semanas postoperatorias (grupo 1 $p=0.008$; grupo 2 $p=0.015$; grupo 3 $p=0.018$ y grupo 4 $p=0.015$) (Tabla 6) (Figura 54).

Igualmente, el mayor nivel en DMO se corresponde a todos los grupos de estudio que fueron intervenidos con BCs + CMM-BAB que en aquellos que fueron tratados con BCs con diferencias estadísticamente significativas en los grupos evaluados a las 4 semanas (grupo 1 $p=0.021$, grupo 2 $p=0.021$, grupo 3 $p=0.021$ y grupo 4 $p=0.021$) y a las 8 semanas del tratamiento quirúrgico (grupo 1 $p=0.020$, grupo 2 $p=0.021$, grupo 3 $p=0.021$ y grupo 4 $p=0.021$) (Tabla 7)

| ESCALA UNION RADIOLOGICA A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | |
|--|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) |
| 0 | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) |
| 1 | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) |
| 2 | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) |
| 3 | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 1.00 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 0.00 (0.00-1.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 0.00 (0.00-0.00) | 1.50 (1.00-2.00) |
| <i>p-valor</i> | 0.015 | | 0.013 | | 0.022 | | 0.013 | |
| ESCALA UNION RADIOLOGICA A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | |
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) |
| 1 | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) |
| 2 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) |
| 3 | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) |
| Mediana (rango) | 1.00 (1.00-1.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 1.00 (0.00-1.00) | 3.00 (2.00-3.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 0.00 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-3.00) |
| <i>p-valor</i> | 0.008 | | 0.015 | | 0.018 | | 0.015 | |

Tabla 6. Resultados de la escala de unión radiológica (Prueba U de Mann-Whitney).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

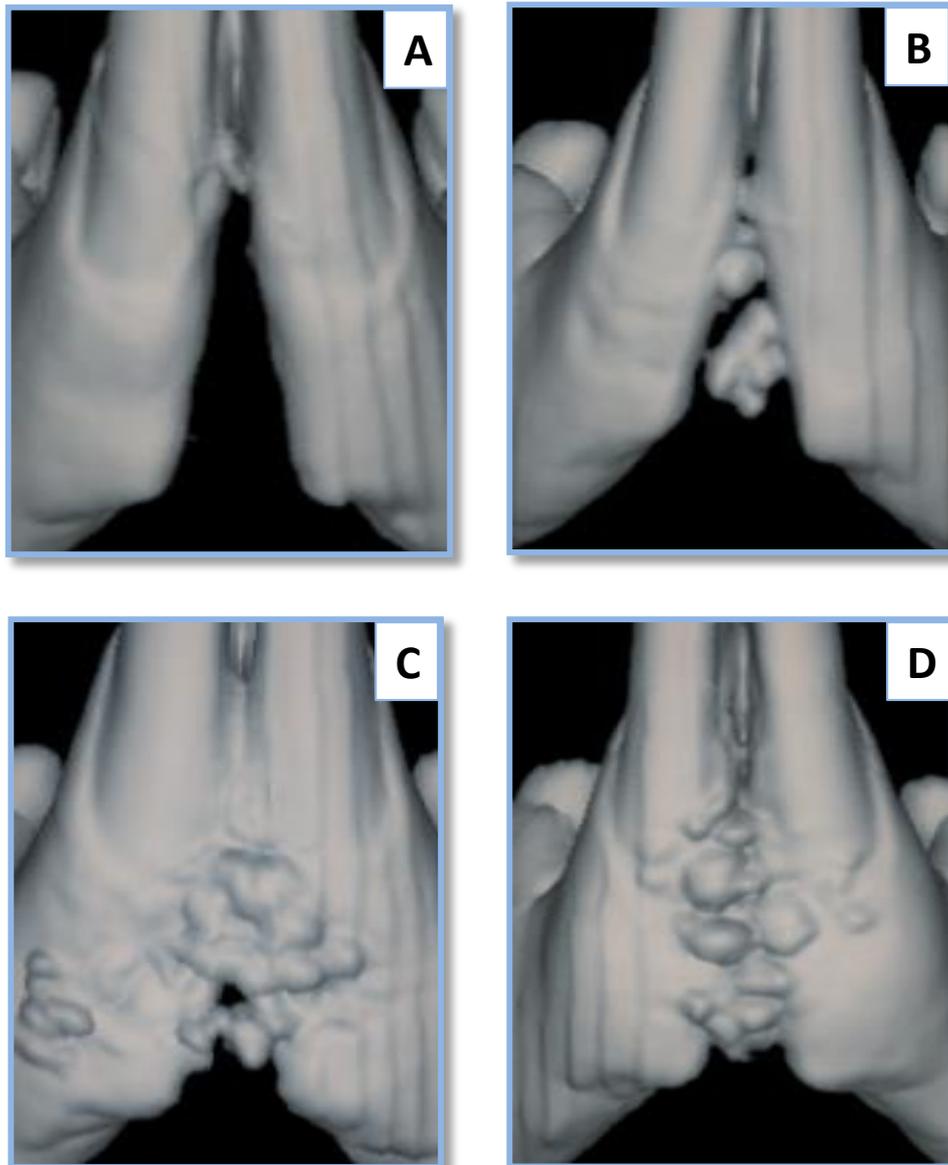


Figura 54. Análisis por micro-CT (unión ósea radiológica). A: Puntuación 0 (formación de nuevo hueso no apreciable), después de la intervención en el grupo osteoporóticas (BCs/4 semanas). B: Puntuación 1 (engrosamiento cortical a lo largo de la sínfisis mandibular) en el grupo sanas (BCs/4 semanas). C: Puntuación 2 (unión ósea con presencia de grietas/fisuras) en el grupo osteoporóticas (BCs + CMM-BAB/8 semanas). D: Puntuación 3 (unión ósea con o sin evidencia de grietas/fisuras) en el grupo sanas (BCs + CMM-BAB/8 semanas).

| DMO A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | | |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|--|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | | |
| | BCs (n=4) | BCs + CMM-BAE (n=4) | BCs (n=4) | BCs + CMM-BAE (n=4) | BCs (n=4) | BCs + CMM-BAE (n=4) | BCs (n=4) | BCs + CMM-BAE (n=4) | |
| Mediana (rango) | 261.34 (138.46-273.48) | 450.33 (441.32-462.46) | 215.56 (196.14-221.38) | 363.65 (342.80-375.52) | 101.51 (95.50-106.36) | 219.10 (212.71-230.23) | 95.29 (89.24-102.78) | 214.15 (202.17-223.43) | |
| p-valor | 0.021 | | 0.021 | | 0.021 | | 0.021 | | |
| DMO A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | | |
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | | |
| | BCs (n=4) | BCs + CMM-BAE (n=4) | BCs (n=4) | BCs + CMM-BAE (n=4) | BCs (n=4) | BCs + CMM-BAE (n=4) | BCs (n=4) | BCs + CMM-BAE (n=4) | |
| Mediana (rango) | 493.48 (476.19-502.55) | 772.15 (757.41-790.16) | 387.56 (366.12-395.24) | 626.15 (611.33-639.11) | 223.49 (209.79-225.29) | 421.77 (412.41-428.19) | 218.87 (200.24-223.78) | 399.24 (291.18-410.19) | |
| p-valor | 0.020 | | 0.021 | | 0.021 | | 0.021 | | |

Tabla 7. Resultados de la densidad mineral ósea (DMO) en unidades Hounsfield (UH) (Prueba U de Mann-Whitney).

4.1.3. Resultados radiológicos comparativos de la regeneración ósea empleando CMM-MO y CMM-BAB

En todos los grupos de estudio analizados (grupo 1 sanas, grupo 2 diabéticas, grupo 3 osteoporóticas y grupo 4 diabéticas-osteoporóticas) se observa leve mejora en la puntuación de la regeneración del defecto óseo obtenida mediante micro-CT, sin diferencias estadísticamente significativas, cuando son tratados con BCs + CM-BAB que al intervenirlos con BCs + CMM-MO tanto a las 4 semanas de la cirugía (grupo 1 $p=0.317$, grupo 2 $p=0.317$, grupo 3 $p=0.495$ y grupo 4 $p=0.495$) como a las 8 semanas (grupo 1 $p=0.317$, grupo 2 $p=0.495$, grupo 3 $p=0.495$ y grupo 4 $p=0.317$) (Tabla 8).

Los valores más altos alcanzados en la escala de unión radiológica correspondientes a una mayor DMO son logrados por aquellos grupos donde se implantó en el defecto óseo BCs + CM-BAB, aunque sin haber diferencias estadísticamente significativas, en todos los grupos analizados a las 4 semanas (grupo 1 $p=0.386$, grupo 2 $p=0.157$, grupo 3 $p=0.248$ y grupo 4 $p=0.386$) y a las 8 semanas después del tratamiento quirúrgico (grupo 1 $p=0.480$, grupo 2 $p=0.386$, grupo 3 $p=0.149$ y grupo 4 $p=0.724$) (Tabla 9).

| ESCALA DE UNIÓN RADIOLOGICA A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | |
|---|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------|------------------|
| Puntuación (n=4) | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB (n=4) | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB (n=4) | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB (n=4) | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB |
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 1 (25) | 3 (75) | 2 (50) |
| 2 | 4 (100) | 3 (75) | 3 (75) | 4 (100) | 2 (50) | 3 (75) | 1 (25) | 2 (50) |
| 3 | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 2.00 (2.00-2.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 1.50 (1.00-2.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 1.00 (1.00-2.00) | 1.50 (1.00-2.00) |
| p-valor | 0.317 | | 0.317 | | 0.495 | | 0.495 | |

| ESCALA DE UNIÓN RADIOLOGICA A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | |
|---|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-----------------------------|------------------|
| Puntuación (n=4) | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB (n=4) | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB (n=4) | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB (n=4) | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB |
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 2 | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 1 (25) | 3 (75) | 2 (50) | 4 (100) | 3 (75) |
| 3 | 3 (75) | 4 (100) | 2 (50) | 3 (75) | 1 (25) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) |
| Mediana (rango) | 3.00 (2.00-3.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 3.00 (2.00-3.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 2.00 (2.00-3.00) |
| p-valor | 0.317 | | 0.495 | | 0.495 | | 0.317 | |

Tabla 8. Comparación entre los grupos de estudio de la escala de unión ósea radiológica (Prueba U de Mann-Whitney).

| DMO A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Puntuación (n=4) | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB (n=4) | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB (n=4) | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB (n=4) | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB |
| | n (%) | n (%) |
| Mediana (rango) | 443.24 (436.29-455.57) | 450.33 (441.32-462.46) | 356.19 (336.57-368.21) | 363.65 (342.80-375.82) | 212.66 (205.45-223.93) | 219.10 (212.71-230.23) | 206.73 (195.48-215.11) | 214.15 (202.17-223.43) |
| p-valor | 0.386 | | 0.157 | | 0.248 | | 0.386 | |

| DMO A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Puntuación (n=4) | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB (n=4) | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB (n=4) | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB (n=4) | BC3 + CMM-MO (n=4) | BC3 + CMM-BAB |
| | n (%) | n (%) |
| Mediana (rango) | 764.41 (750.12-781.32) | 772.25 (757.41-790.16) | 619.31 (603.78-632.45) | 626.15 (611.33-639.11) | 414.57 (405.28-420.16) | 421.77 (412.41-428.19) | 390.23 (282.14-400.15) | 399.24 (291.18-410.19) |
| p-valor | 0.480 | | 0.386 | | 0.149 | | 0.724 | |

Tabla 9. Comparación entre los grupos de estudio de la densidad mineral ósea (DMO) en unidades Hounsfield (UH) (Prueba U de Mann-Whitney).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

4.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO (UNIÓN ÓSEA HISTOLÓGICA)

4.2.1. Resultados de la regeneración ósea empleando CMM-MO

El análisis histológico demuestra que la unión ósea mayor puntuación en todos los grupos de estudio (grupo 1 sanas, grupo 2 diabéticas, grupo 3 osteoporóticas y grupo 4 diabéticas-osteoporóticas) tratados con BCs + CMM-MO en comparación con aquellos grupos tratados únicamente con BCs con diferencias estadísticamente significativas tanto a las 4 semanas de la intervención quirúrgica (grupo 1 $p=0.011$, grupo 2 $p=0.011$, grupo 3 $p=0.032$ y grupo 4 $p=0.032$) y a las 8 semanas (grupo 1 $p=0.011$, grupo 2 $p=0.013$, grupo 3 $p=0.015$ y grupo 4 $p=0.013$) (Tabla 10) (Figura 55).

| ESCALA DE UNION HISTOLOGICA A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | |
|---|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) |
| 1 | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 1 (25) | 1 (25) | 2 (50) |
| 2 | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) |
| 3 | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 1.00 (1.00-1.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 1.00 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 0.00 (0.00-1.00) | 1.50 (1.00-2.00) |
| <i>p-valor</i> | 0.011 | | 0.011 | | 0.032 | | 0.032 | |

| ESCALA DE UNION HISTOLOGICA A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | |
|---|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) |
| 1 | 3 (75) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) |
| 2 | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 4 (100) |
| 3 | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 1.00 (1.00-2.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 1.00 (1.00-1.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 1.00 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-2.00) |
| <i>p-valor</i> | 0.011 | | 0.013 | | 0.015 | | 0.013 | |

Tabla 10. Resultados de la escala de unión histológica (Prueba U de Mann-Whitney).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

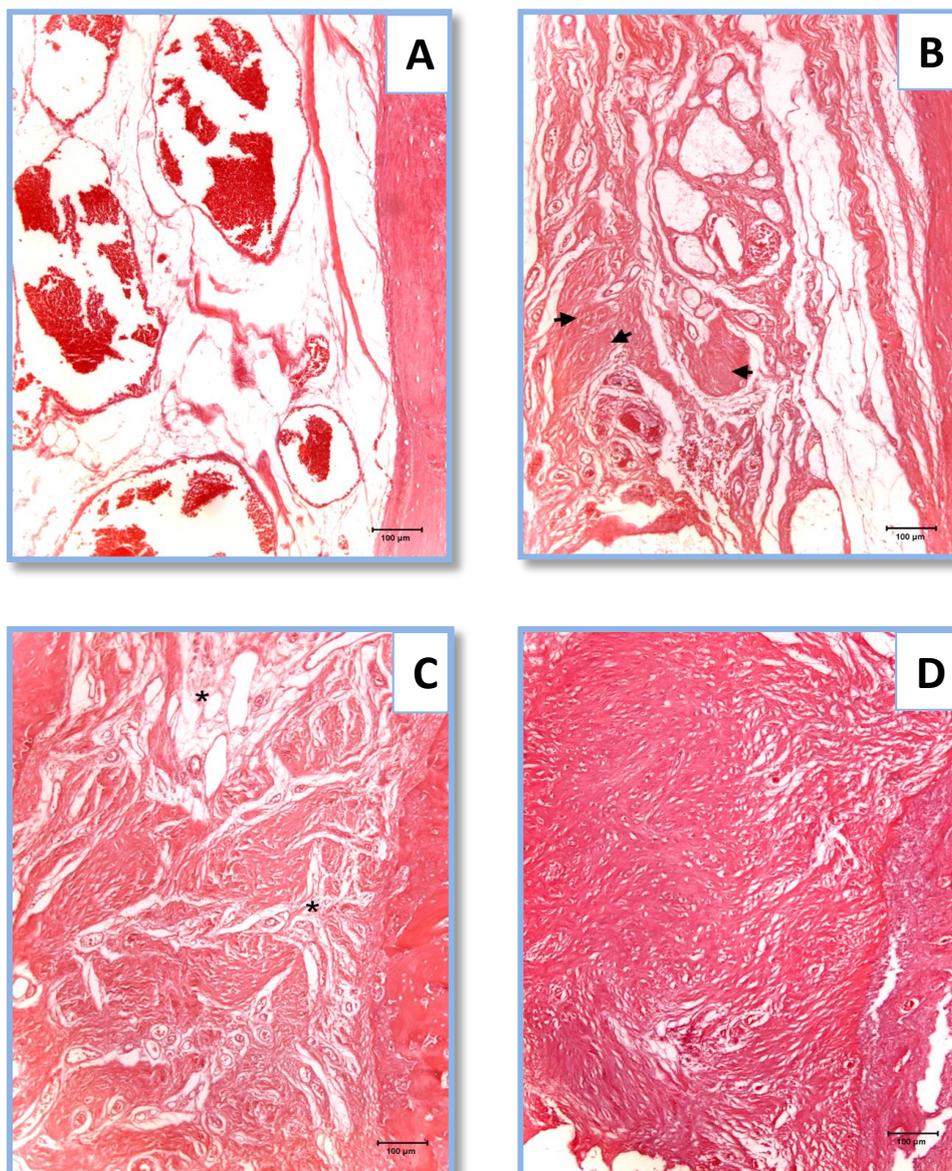


Figura 55. Análisis histológico. A: Puntuación 0 (unión fibrosa con rastro de nuevo cartílago/formación ósea), tras la cirugía en el grupo diabéticas + osteoporóticas (BCs/8 semanas) se puede apreciar unión fibrosa con presencia de vasos sanguíneos. B: Puntuación 1 (unión fibrosa con algún nuevo cartílago/áreas de hueso) en el grupo osteoporóticas (BCs/8 semanas) obsérvese unión fibrosa con áreas osteogénicas (flechas). C: Puntuación 2 (unión ósea con áreas cartilaginosas) en el grupo diabéticas (BCs + CMM-MO/8 semanas) nótese presencia de áreas fibróticas en zonas de formación de nuevo hueso señaladas por asterisco. D: Puntuación 3 (unión ósea completa sin áreas cartilaginosas) en el grupo sanas (BCs + CMM-MO/8 semanas).

4.2.2. Resultados de la regeneración ósea empleando CMM-BAB

El análisis histológico demuestra que la unión ósea mayor puntuación en todos los grupos de estudio (grupo 1 sanas, grupo 2 diabéticas, grupo 3 osteoporóticas y grupo 4 diabéticas-osteoporóticas) tratados con BCs + CMM-BAB en comparación con aquellos grupos tratados únicamente con BCs con diferencias estadísticamente significativas tanto a las 4 semanas de la intervención quirúrgica (grupo 1 $p=0.013$, grupo 2 $p=0.015$, grupo 3 $p=0.013$ y grupo 4 $p=0.022$) y a las 8 semanas (grupo 1 $p=0.011$, grupo 2 $p=0.011$, grupo 3 $p=0.017$ y grupo 4 $p=0.017$) (Tabla 11) (Figura 56).

| ESCALA DE UNION HISTOLOGICA A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | |
|---|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) |
| 1 | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 1 (25) |
| 2 | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) |
| 3 | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 1.00 (1.00-1.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 1.00 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 0.00 (0.00-1.00) | 2.00 (1.00-2.00) |
| p-valor | 0.013 | | 0.015 | | 0.013 | | 0.022 | |

| ESCALA DE UNION HISTOLOGICA A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | |
|---|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) |
| 1 | 3 (75) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) |
| 2 | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) |
| 3 | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) |
| Mediana (rango) | 1.00 (1.00-2.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 1.00 (1.00-1.00) | 3.00 (2.00-3.00) | 1.00 (0.00-1.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-3.00) |
| p-valor | 0.011 | | 0.011 | | 0.017 | | 0.017 | |

Tabla 11. Resultados de la escala de unión histológica (Prueba U de Mann-Whitney).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

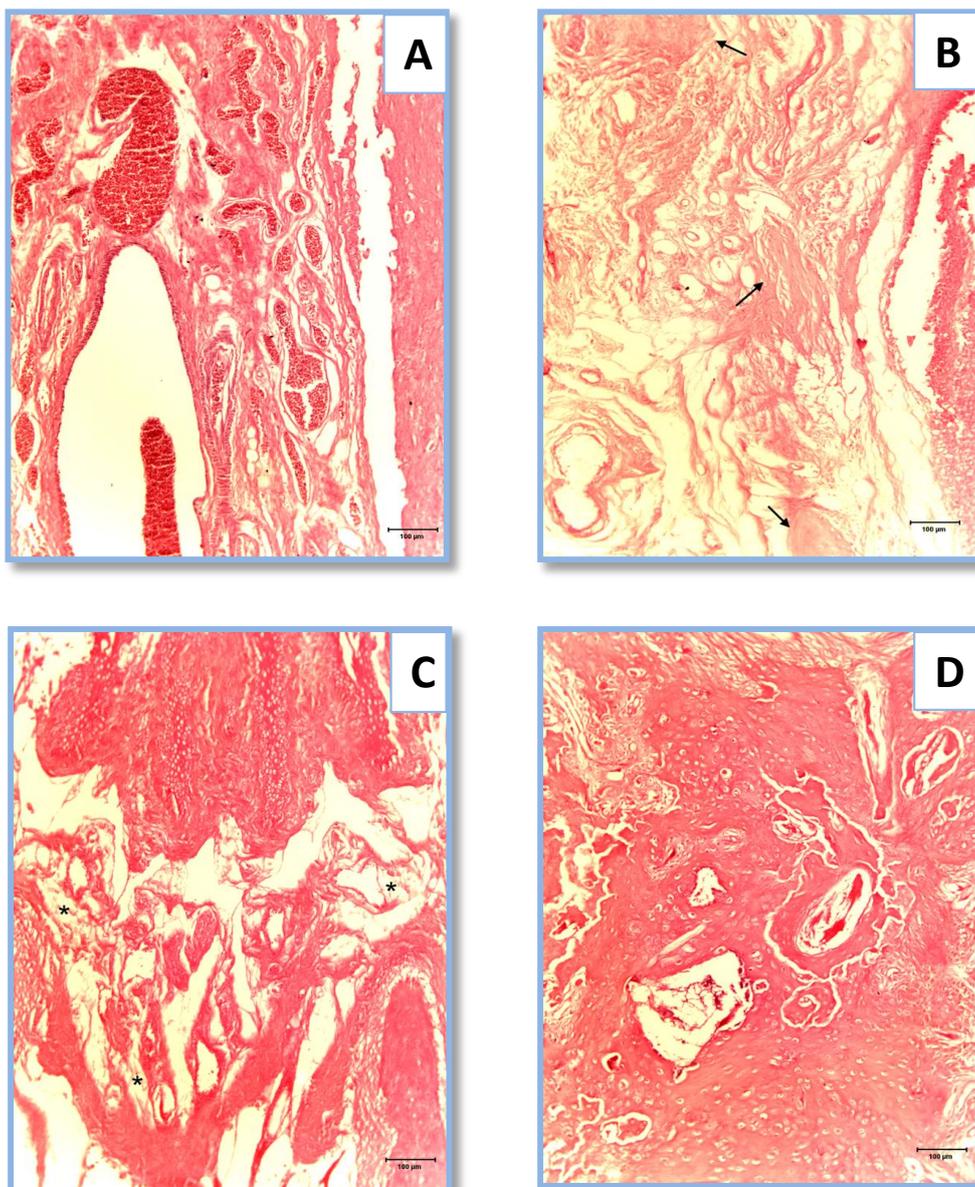


Figura 56. Análisis histológico. A: Puntuación 0 (unión fibrosa con rastro de nuevo cartílago/formación ósea), tras la cirugía en el grupo osteoporóticas (BCs/4 semanas) se puede valorar unión fibrosa con presencia de vasos sanguíneos. B: Puntuación 1 (unión fibrosa con algún nuevo cartílago/áreas de hueso) en el grupo osteoporóticas (BCs/8 semanas) obsérvese unión fibrosa con ciertas áreas osteogénicas (flechas). C: Puntuación 2 (unión ósea con áreas cartilaginosas) en el grupo osteoporóticas (BCs + CMM-BAB/8 semanas) nótese presencia de áreas fibróticas en zonas de formación de nuevo hueso señaladas por asterisco. D: Puntuación 3 (unión ósea completa sin áreas cartilaginosas) en el grupo sanas (BCs + CMM-BAB/8 semanas).

4.2.3. Resultados histológicos comparativos de la regeneración ósea empleando CMM-MO y CMM-BAB

En todos los grupos de estudio analizados (grupo 1 sanas, grupo 2 diabéticas, grupo 3 osteoporóticas y grupo 4 diabéticas-osteoporóticas) se observa leve mejora en la puntuación de la regeneración del defecto óseo obtenida mediante tinción con hematoxilina-eosina y azul de toluidina, pero sin diferencias estadísticamente significativas, cuando son tratados con BCs + CM-BAB que al ser intervenidos con BCs + CMM-MO tanto a las 4 semanas de la cirugía (grupo 1 $p=0.495$, grupo 2 $p=0.317$, grupo 3 $p=0.317$ y grupo 4 $p=0.495$) como a las 8 semanas (grupo 1 $p=1.000$, grupo 2 $p=0.495$, grupo 3 $p=0.495$ y grupo 4 $p=0.317$) (Tabla 12).

| ESCALA DE UNION HISTOLOGICA A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | |
|---|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 1 (25) |
| 2 | 3 (75) | 2 (50) | 4 (100) | 3 (75) | 3 (75) | 4 (100) | 2 (50) | 3 (75) |
| 3 | 1 (25) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 2.00 (2.00-3.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 1.50 (1.00-2.00) | 2.00 (1.00-2.00) |
| p-valor | 0.495 | | 0.317 | | 0.317 | | 0.495 | |

| ESCALA DE UNION HISTOLOGICA A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | |
|---|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 2 | 0 (0) | 0 (0) | 2 (50) | 1 (25) | 3 (75) | 2 (50) | 4 (100) | 3 (75) |
| 3 | 4 (100) | 4 (100) | 2 (50) | 3 (75) | 1 (25) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) |
| Mediana (rango) | 3.00 (3.00-3.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 3.00 (2.00-3.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 2.00 (2.00-3.00) |
| p-valor | 1.000 | | 0.495 | | 0.495 | | 0.317 | |

Tabla 12. Comparación de la escala de unión histológica entre BC + CMM-MO y BC + CMM-BAB (Prueba U de Mann-Whitney).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

4.3. ANÁLISIS INMUEHISTOQUÍMICO

4.3.1. Expresión de FCEV

Finalmente, la expresión de FCEV se observó en áreas de osificación en células mesenquimatosas pobremente diferenciadas con morfología fusiforme o estrellada, citoplasma ampuloso y núcleo eucromático. En áreas donde aparece tejido óseo bien diferenciado se observó en células fusiformes localizadas en el periostio y en menor medida en algunos osteoblastos. Ocasionalmente, también se observa en los vasos sanguíneos de los conductos de Havers.

4.3.1.1. Resultados de la regeneración ósea empleando CMM-MO

Este análisis muestra una gran positividad en todos los grupos de estudio cuyos defectos óseos fueron tratados con BCs + CMM-MO en comparación con los defectos donde se implantaron BCs solas con diferencias estadísticamente significativas a las 4 semanas de la cirugía en los grupos 3 y 4 ($p=0.032$ en ambos) y a las 8 semanas en los grupos 2, 3 y 4 ($p=0.013$, $p=0.013$, and $p=0.025$ respectivamente) (Tabla 13) (Figura 57).

| EXPRESION DE FCEV A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 2 (50) | 1 (25) | 2 (50) | 1 (25) | 1 (25) | 2 (50) |
| 2 | 4 (100) | 2 (50) | 1 (25) | 3 (75) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) |
| 3 | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 2.00 (2.00-2.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 1.00 (0.00-2.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 0.00 (0.00-1.00) | 1.50 (1.00-2.00) |
| <i>p-valor</i> | 0.127 | | 0.155 | | 0.032 | | 0.032 | |
| EXPRESION DE FCEV A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | |
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) |
| 2 | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 1 (25) | 1 (25) |
| 3 | 3 (75) | 4 (100) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) |
| Mediana (rango) | 3.00 (2.00-3.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 1.50 (1.00-2.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 1.00 (0.00-2.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 0.50 (0.00-2.00) | 3.00 (2.00-3.00) |
| <i>p-valor</i> | 0.317 | | 0.013 | | 0.013 | | 0.025 | |

Tabla 13. Resultados de la expresión de FCEV (Prueba U de Mann-Whitney).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

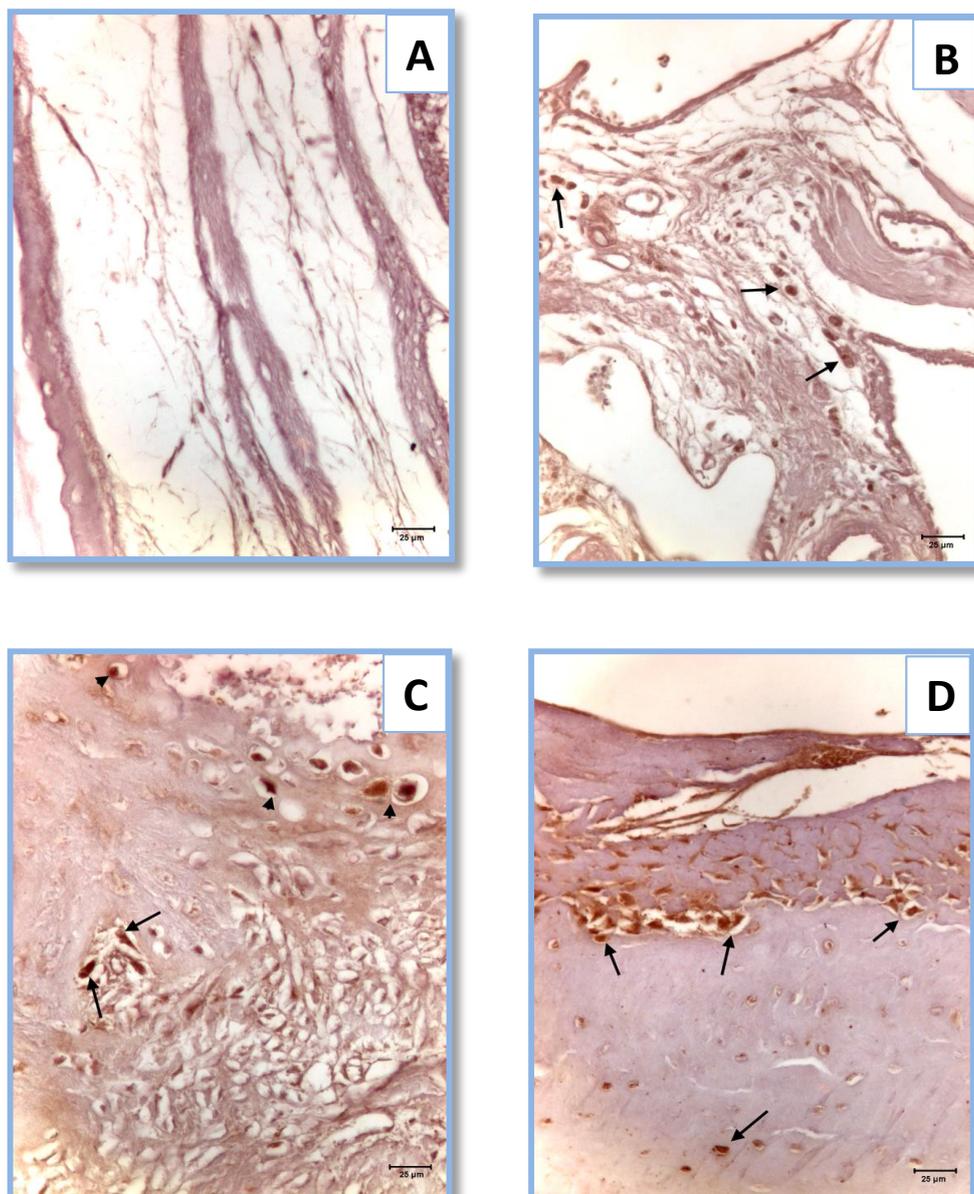


Figura 57. Expresión de FCEV en células mesenquimales (flechas) o condrocitos (cabeza de flecha). A: Puntuación 0 (negativo) después de la cirugía en el grupo diabéticas + osteoporóticas (BCs/8 semanas). B: Puntuación 1 (leve) en el grupo grupo diabéticas + osteoporóticas (BCs/8 semanas). C: Puntuación 2 (moderada) en grupo osteoporóticas (BCs/8 semanas). D: Puntuación 3 (relevante) en el grupo osteoporóticas (BCs + CMM-MO/8 semanas).

4.3.1.2. Resultados de la regeneración ósea empleando CMM-BAB

Este análisis muestra una elevada positividad en todos los grupos de estudios cuando los defectos óseos de tamaño crítico se tratan con BCs + CMM-BAB en comparación con aquellos grupos intervenidos únicamente con BCs con diferencias estadísticamente significativas a las 4 semanas del tratamiento diferencias estadísticamente significativas (grupo 1 $p=0.040$, grupo 2 $p=0.046$, grupo 3 $p=0.013$ y grupo 4 $p=0.022$) y a las 8 semanas en los grupos 2, 3 y 4 (grupo 2 $p=0.013$, grupo 3 $p=0.013$, grupo 4 $p=0.025$) (Tabla 14) (Figura 58).

| EXPRESIÓN FCEV A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 1 (25) |
| 2 | 4 (100) | 1 (25) | 1 (25) | 4 (100) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) |
| 3 | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 2.00 (2.00-2.00) | 3.00 (2.00-3.00) | 1.00 (0.00-2.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 0.00 (0.00-1.00) | 2.00 (1.00-2.00) |
| <i>p</i> -valor | 0.040 | | 0.046 | | 0.013 | | 0.022 | |
| EXPRESIÓN FCEV A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | |
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) |
| 2 | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 1 (25) | 1 (25) |
| 3 | 3 (75) | 4 (100) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) |
| Mediana (rango) | 3.00 (2.00-3.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 1.50 (1.00-2.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 1.00 (0.00-2.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 0.50 (0.00-2.00) | 3.00 (2.00-3.00) |
| <i>p</i> -valor | 0.317 | | 0.013 | | 0.013 | | 0.025 | |

Tabla 14. Resultados de la expresión de FCEV (Prueba U de Mann-Whitney).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

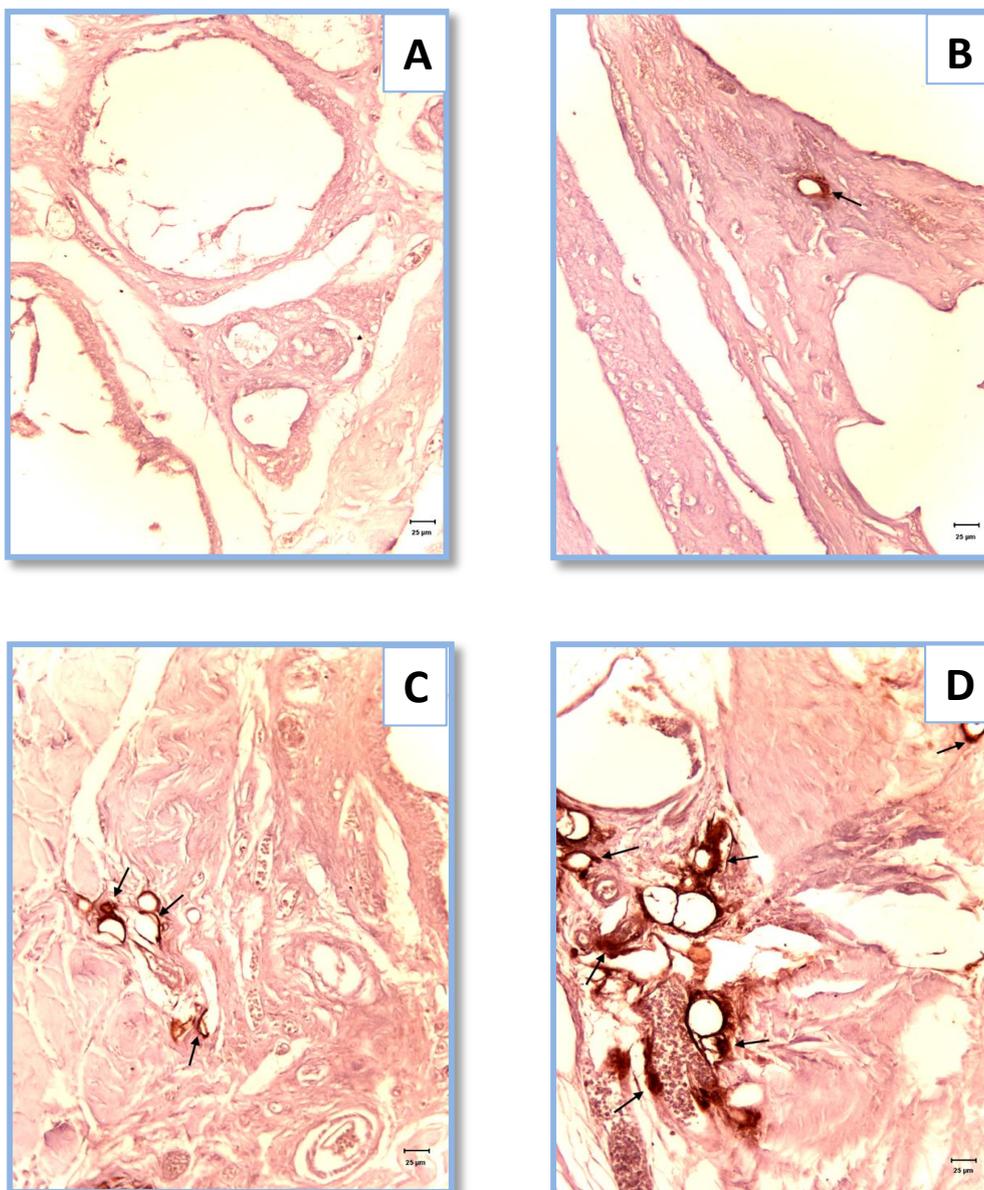


Figura 58. Expresión de FCEV en células mesenquimales (flechas) o condrocitos (cabeza de flecha). A: Puntuación 0 (negativo) después de la cirugía en el grupo osteoporóticas (BCs/4 semanas). B: Puntuación 1 (leve) en el grupo grupo osteoporóticas (BCs/8 semanas). C: Puntuación 2 (moderada) en grupo osteoporóticas (BCs/8 semanas). D: Puntuación 3 (relevante) en el grupo osteoporóticas (BCs + CMM-BAB/8 semanas).

4.3.1.3. Resultados comparativos de la regeneración ósea empleando CMM-MO y CMM-BAB

En todos los grupos de estudio analizados (grupo 1 sanas, grupo 2 diabéticas, grupo 3 osteoporóticas y grupo 4 diabéticas-osteoporóticas) se observa leve mejora en la puntuación de la regeneración del defecto óseo interpretada mediante la expresión de FCEV, aunque sin haber diferencias estadísticamente significativas, cuando son tratados con BCs + CM-BAB que al intervenirlos con BCs + CMM-MO a las 4 semanas del tratamiento quirúrgico (grupo 1 $p=0.495$, grupo 2 $p=0.317$, grupo 3 $p=0.317$ y grupo 4 $p=0.495$). Del mismo modo sucede con lo valores obtenidos a las 8 semanas de haber realizado la cirugía, puesto que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de regeneración ósea; todos los grupos obtuvieron la misma puntuación independientemente si se emplearon CMM-MO o CMM-BAB conjuntamente a las BCs (Tabla 15).

| EXPRESION DE FCEV A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 1 (25) |
| 2 | 2 (50) | 1 (25) | 3 (75) | 4 (100) | 3 (75) | 4 (100) | 2 (50) | 3 (75) |
| 3 | 2 (50) | 3 (75) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 2.50 (2.00-3.00) | 3.00 (2.00-3.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 1.50 (1.00-2.00) | 2.00 (1.00-2.00) |
| p-valor | 0.495 | | 0.317 | | 0.317 | | 0.495 | |

| EXPRESION DE FCEV A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 2 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 1 (25) |
| 3 | 4 (100) | 4 (100) | 4 (100) | 4 (100) | 4 (100) | 4 (100) | 3 (75) | 3 (75) |
| Mediana (rango) | 3.00 (3.00-3.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 3.00 (3.00-3.00) | 3.00 (2.00-3.00) | 3.00 (2.00-3.00) |
| p-valor | 1.000 | | 1.000 | | 1.000 | | 1.000 | |

Tabla 15. Comparación de la expresión de FCEV entre CMM-MO y CMM-BAB (Prueba U de Mann-Whitney).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

4.3.2. Expresión de BMP-2

4.3.2.1. Resultados de la regeneración ósea empleando CMM-MO

La expresión de BMP-2 se produce en las células ubicadas en la matriz ósea (osteocitos/osteoblastos) y es especialmente evidente su presencia en la matriz ósea que se encuentra alrededor de estas células. Este análisis muestra una alta puntuación en la positividad de su expresión en todos los grupos (grupo 1 sanas, grupo 2 diabéticas, grupo 3 osteoporóticas y grupo 4 diabéticas-osteoporóticas) cuando los defectos óseos son operados con BCs + CMM-MO en comparación con aquellos que fueron tratados únicamente con BCs. con diferencias estadísticamente significativas en los grupos 2, 3 y 4 a las 4 semanas ($p=0.096$, $p=0.040$ y $p=0.040$ respectivamente) y a las 8 semanas ($p=0.040$, $p=0.011$ y $p=0.032$ respectivamente) (Tabla 16) (Figura 59).

| Puntuación | EXPRESION DE BMP-2 A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | |
|-----------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) |
| 1 | 2 (50) | 1 (25) | 3 (75) | 2 (50) | 2 (50) | 3 (75) | 1 (25) | 4 (100) |
| 2 | 2 (50) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) |
| 3 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 1.50 (1.00-2.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 1.00 (0.00-1.00) | 1.50 (1.00-2.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 1.00 (1.00-2.00) | 0.00 (0.00-1.00) | 1.00 (1.00-1.00) |
| p-valor | 0.495 | | 0.096 | | 0.096 | | 0.040 | |
| Puntuación | EXPRESION DE BMP-2 A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | |
| | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 1 (25) |
| 2 | 4 (100) | 3 (75) | 1 (25) | 4 (100) | 0 (0) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) |
| 3 | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 2.00 (2.00-2.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 1.00 (1.00-2.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 1.00 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 2.00 (1.00-2.00) |
| p-valor | 0.317 | | 0.040 | | 0.011 | | 0.032 | |

Tabla 16. Resultados de la expresión de BMP-2 (Prueba U de Mann-Whitney).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

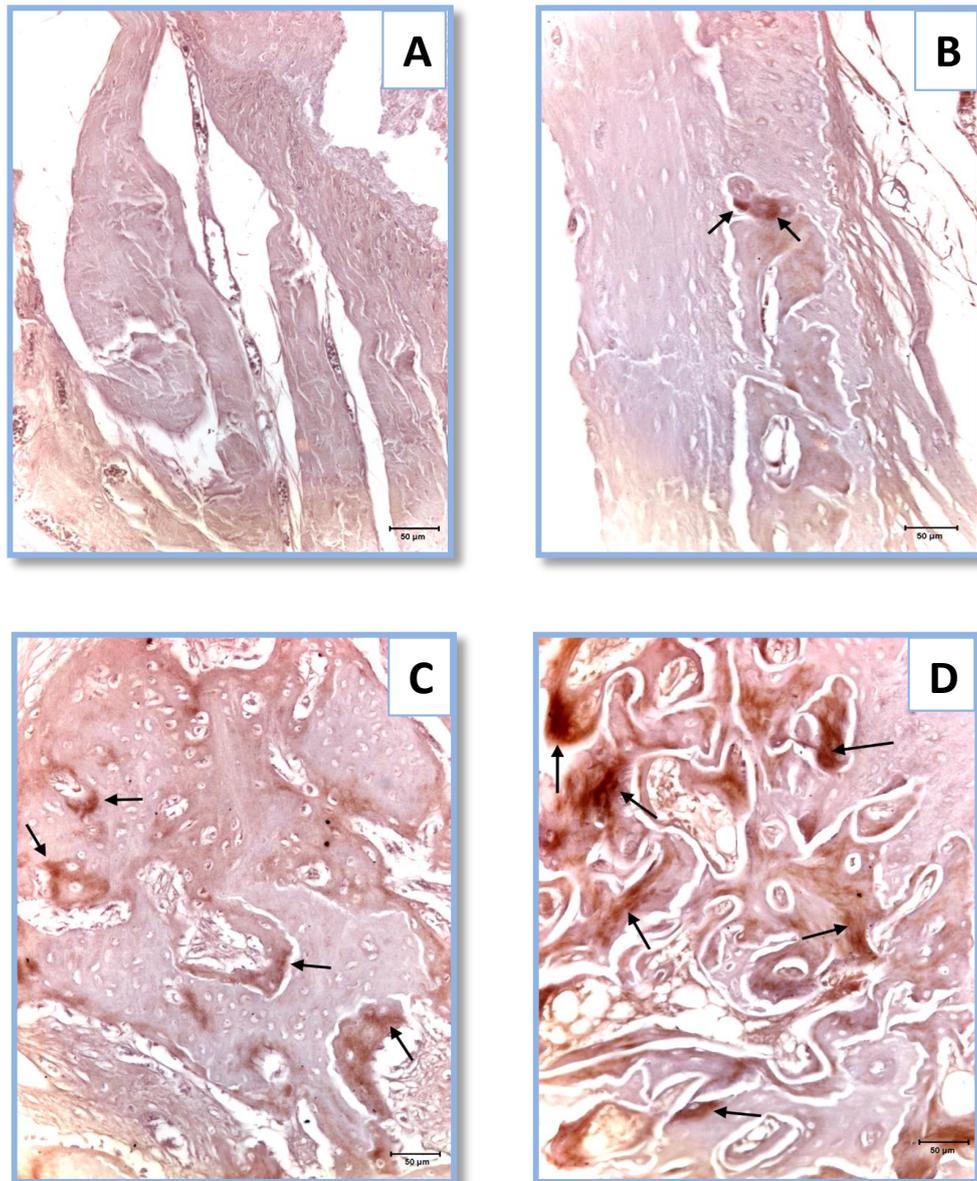


Figura 59. Expresión de BMP-2 en la matriz ósea que rodea las células osteoblásticas (flechas). A: Puntuación 0 (negativo), tras la cirugía en el grupo diabéticas + osteoporóticas (BCs/8 semanas). B: Puntuación 1 (leve) en grupo diabéticas + osteoporóticas (BCs/8 semanas). C: Puntuación 2 (moderado) en grupo osteoporóticas (BCs + CMM-MO/8 semanas). D: Puntuación 3 (relevante) en grupo sanas (BCs + CMM-MO/8 semanas).

4.3.2.2. Resultados de la regeneración ósea empleando CMM-BAB

El análisis la expresión de BMP-2 muestra una alta positividad en los grupos 2, 3 y 4 cuando las lesiones óseas eran tratadas con BCs + CMM-BAB en comparación con aquellos que únicamente son intervenidos con BCs tanto a las 4 semanas del tratamiento con diferencias estadísticamente significativas ($p=0.040$, $p=0.061$ y $p=0.040$ respectivamente) como a las 8 semanas ($p=0.040$, $p=0.015$ y $p=0.013$ respectivamente) (Table 17) (Figura 60).

| EXPRESION DE BMP-2 A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | | | |
|------------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--|
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | |
| 1 | 2 (50) | 0 (0) | 3 (75) | 1 (25) | 2 (50) | 2 (50) | 1 (25) | 3 (75) | |
| 2 | 2 (50) | 4 (100) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | |
| 3 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | |
| Mediana (rango) | 1.50 (1.00-2.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 1.00 (0.00-1.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 1.50 (1.00-2.00) | 0.00 (0.00-1.00) | 1.00 (1.00-2.00) | |
| p-valor | 0.127 | | 0.040 | | 0.061 | | 0.040 | | |
| EXPRESION DE BMP-2 A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | | | |
| Puntuación | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | | |
| | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | |
| 2 | 4 (100) | 2 (50) | 1 (25) | 3 (75) | 0 (0) | 3 (75) | 0 (0) | 4 (100) | |
| 3 | 0 (0) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) | |
| Mediana (rango) | 2.00 (2.00-2.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 1.00 (1.00-2.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 1.00 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 0.50 (0.00-1.00) | 2.00 (2.00-2.00) | |
| p-valor | 0.127 | | 0.040 | | 0.015 | | 0.013 | | |

Tabla 17. Resultados de la expresión de BMP-2 (Prueba U de Mann-Whitney).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

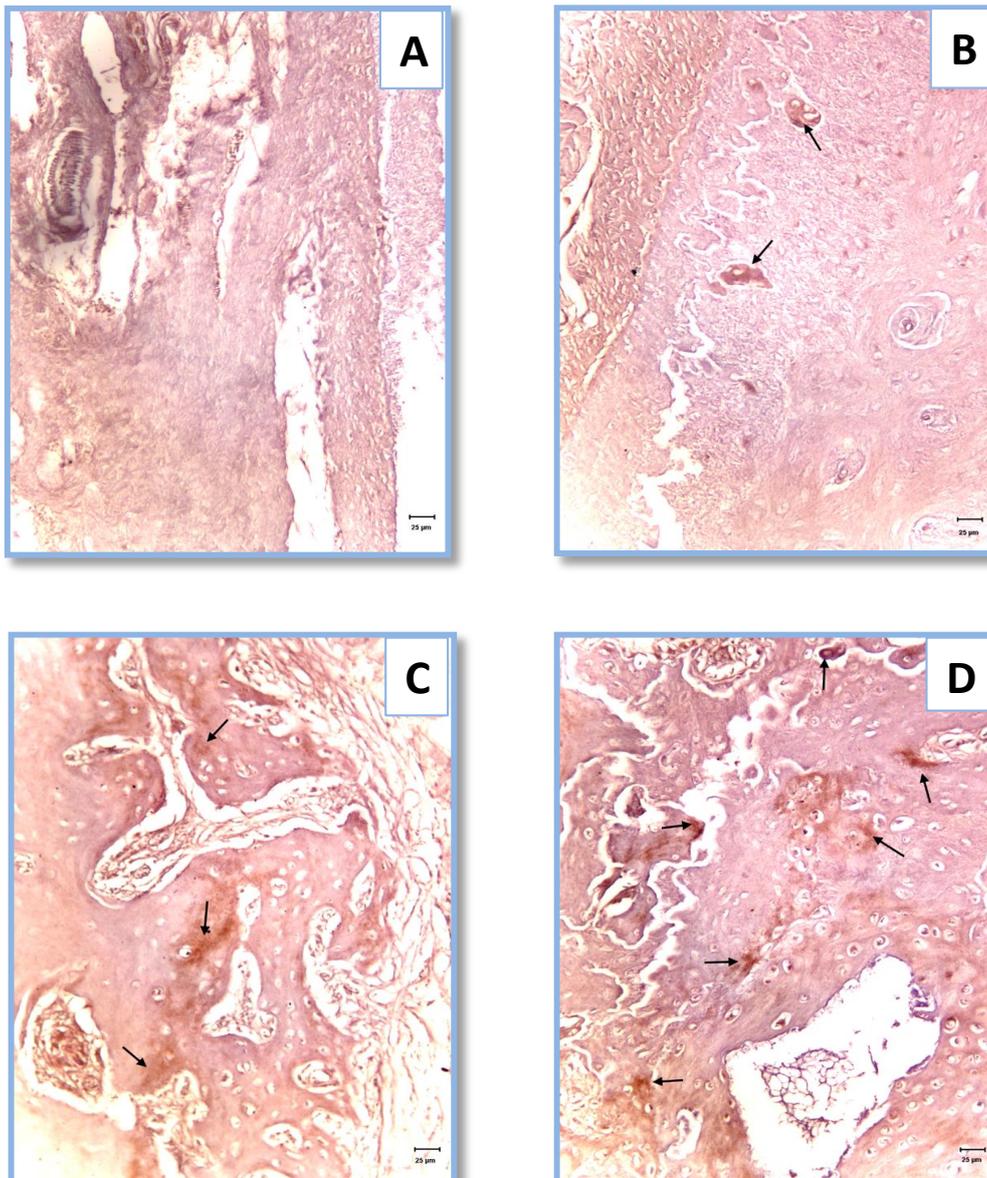


Figura 60. Expresión de BMP-2 en la matriz ósea que rodea las células osteoblásticas (flechas). A: Puntuación 0 (negativo), tras la cirugía en el grupo osteoporóticas (BCs/4 semanas). B: Puntuación 1 (leve) en grupo osteoporóticas (BCs/8 semanas). C: Puntuación 2 (moderado) en grupo sanas (BCs + CMM-BAB/8 semanas). D: Puntuación 3 (relevante) en grupo osteoporóticas (BCs + CMM-BAB/8 semanas).

4.3.2.3. Resultados comparativos de la regeneración ósea empleando CMM-MO y CMM-BAB

En todos los grupos de estudio analizados (grupo 1 sanas, grupo 2 diabéticas, grupo 3 osteoporóticas y grupo 4 diabéticas-osteoporóticas) se observa cierta mejora en la puntuación de la regeneración del defecto óseo interpretada mediante la expresión de BMP-2, pero sin diferencias estadísticamente significativas, cuando son tratados con BCs + CM-BAB que al intervenirlos con BCs + CMM-MO a las 4 semanas del tratamiento quirúrgico (grupo 1 $p=0.317$, grupo 2 $p=0.495$, grupo 3 $p=0.495$ y grupo 4 $p=0.317$) al igual que a las 8 semanas del mismo (grupo 1 $p=0.495$, grupo 2 $p=0.317$, grupo 3 $p=0.317$ y grupo 4 $p=0.317$) (Tabla 18).

| Puntuación | EXPRESIÓN DE BMP-2 A LAS 4 SEMANAS | | | | | | | |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 1 | 1 (25) | 0 (0) | 2 (50) | 1 (25) | 3 (75) | 2 (50) | 4 (100) | 3 (75) |
| 2 | 3 (75) | 4 (100) | 2 (50) | 3 (75) | 1 (25) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) |
| 3 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 2.00 (1.00-2.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 1.50 (1.00-2.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 1.00 (1.00-2.00) | 1.50 (1.00-2.00) | 1.00 (1.00-1.00) | 1.00 (1.00-2.00) |
| <i>p</i> -valor | 0.317 | | 0.495 | | 0.495 | | 0.317 | |
| Puntuación | EXPRESIÓN DE BMP-2 A LAS 8 SEMANAS | | | | | | | |
| | Sanas | | Diabéticas | | Osteoporóticas | | Diabéticas + Osteoporóticas | |
| | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) | BCs + CMM-MO (n=4) n (%) | BCs + CMM-BAB (n=4) n (%) |
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 1 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) |
| 2 | 3 (75) | 2 (50) | 4 (100) | 3 (75) | 4 (100) | 3 (75) | 3 (75) | 4 (100) |
| 3 | 1 (25) | 2 (50) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 1 (25) | 0 (0) | 0 (0) |
| Mediana (rango) | 2.00 (2.00-3.00) | 2.50 (2.00-3.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 2.00 (2.00-2.00) | 2.00 (2.00-3.00) | 2.00 (1.00-2.00) | 2.00 (2.00-2.00) |
| <i>p</i> -valor | 0.495 | | 0.317 | | 0.317 | | 0.317 | |

Tabla 18. Comparación de la expresión de BMP-2 entre CMM-MO y CMM-BAB (Prueba U de Mann-Whitney).

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

V.DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En la actualidad, uno de los principales retos en el área de la cirugía ortopédica maxilofacial es la regeneración de defectos óseos tridimensionales con pérdida de una gran parte del volumen total de cualquiera de los maxilares, ya que en estos casos es imposible la restauración funcional y estética en pacientes con ausencias dentales parciales o totales sin un correcto tratamiento previo de regeneración o sustitución ósea (Buurman DJM y cols., 2020; Song Z y cols., 2015; Streckbein P y cols., 2019). En este sentido, resulta imprescindible realizar estudios preclínicos con animales de experimentación donde se generan estos DOTC consecuencia de deformidades congénitas, traumatismos o cirugía ablativa en cáncer, para posteriormente comprobar la eficacia de diferentes técnicas de ingeniería tisular ósea, como alternativa al tratamiento convencional con injertos óseos (Buurman DJM y cols., 2020; Song Z y cols., 2015) Cabe destacar que estos defectos se definen como aquellos con la mínima longitud a partir de la cual no pueden cicatrizar espontáneamente dando como resultado tejido conectivo fibroso en lugar de tejido óseo cuando no se realiza ningún tratamiento sobre ellos (Gosain AK y cols., 2000).

El modelo animal debe ser cuidadosamente seleccionado para obtener unos resultados preclínicos lo más próximos a la realidad en la especie humana con similares características anatómicas, fisiológicas, y fisiopatológicas (Gothard D y cols., 2014). En la revisión de la literatura publicada por O'Loughlin y cols (O'Loughlin PF y cols., 2008) resaltaron que en estudios de regeneración ósea existía una mayor preferencia de los investigadores por las ratas (38% de los estudios), seguido por los conejos (19%), ratones (15%), ovejas (11%), perros (9%), cabras (4%), y el 4% restante estaba compuesto por una amplia selección de especies animales usadas con menor frecuencia. La posible explicación para el uso predilecto por ratas como modelo de regeneración ósea es su alta biodisponibilidad, bajo coste, manejo sencillo en el laboratorio, baja tasa de rechazo del biomaterial implantado así como una composición química asimilar al hueso humano (Pinheiro FA y cols., 2014).

En lo referente a la localización anatómica del mismo teniendo en cuenta que el hueso donde se realice el defecto tenga las condiciones de carga masticatoria que tienen los maxilares; un factor primordial en el área maxilofacial al necesitar un tamaño

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

suficiente para no cicatrizar espontáneamente, numerosas investigaciones en regeneración ósea maxilar han usado áreas extraorales para crear los DOTCs; en particular, la calota y el fémur; sin embargo estas ubicaciones óseas no tienen las condiciones de carga masticatoria que tienen los maxilares (Barbirato DDS y cols., 2018; Ezirganlı Ş y cols., 2014; Oliveira GR y cols., 2019; Zhang Q y cols., 2018).

Además, cualquier intervención quirúrgica realizada en los huesos maxilares para la creación de un DOTC, supone un proceso inherente al hueso de reparación ósea, lo que puede afectar a la interpretación de los resultados de los diferentes tratamientos que estamos estudiando (Yagyuu T y cols., 2015). En este sentido, al provocar quirúrgicamente un DOTC se produce una reacción inflamatoria donde moléculas proinflamatorias como las IL-1, IL-6, IL-11, IL-18, y el TNF- α reclutan células del sistema inmune hacia el foco inflamatorio promoviendo la angiogénesis, a través de la estimulación de la producción de FCEV por parte de los osteoblastos (Marsell R y cols., 2011). En este proceso inflamatorio inicial donde se produce una hemorragia por la lesión ocasionada al generar el DOTC, además de las células procedentes de la sangre periférica van a participar células de la médula ósea entre las que se encuentran células madre que se diferenciarán hacia células osteogénicas. Por lo que, tras un estadio inflamatorio inicial, se formará un hueso inmaduro que finalmente dará lugar a hueso maduro (Gerstenfeld LC y cols., 2003). Sin embargo, el presente estudio eliminó la acción del proceso de regeneración inherente al crear un DOTC experimental iatrogénico, ya que podría alterar cualquier análisis del biomaterial bajo investigación. De este modo, no se ha creado un defecto óseo pero hemos tomado ventaja del hecho que la sínfisis mandibular presenta una solución de continuidad en la sínfisis mandibular puesto que presenta tejido conectivo fibrosos que se interpone entre la hemimandíbula derecha e izquierda. Así, este hecho particular hace que la sínfisis mandibular de la rata sea considerada como un defecto óseo natural que ha sido utilizada por varios investigadores como un modelo de no unión ósea congénita en los ensayos de regeneración ósea. Aplicando este principio, en el año 2015 Yagyuu y cols (Yagyuu T y cols., 2015) acudieron a este DOTC inhato para la evaluación de la terapia celular comparando dos tipos de tratamiento para la regeneración ósea de este DOTC: β -TCP sólo o β -TCP en combinación con CMM-MO. En el año 2016 Ueyama y cols (Ueyama T y cols., 2016) usaron este mismo modelo para comparar la capacidad regenerativa de la matriz celular osteogénica en defectos sin tratar. Finalmente, en 2020 Camacho-Alonso y cols (Camacho-Alonso F y cols., 2020) escogieron este *Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis*

modelo natural de DOTC para comparar la formación de hueso mediante el tratamiento con HA sola o HA asociada a simvastatina.

Por otra parte, en el desarrollo de la ITO como tratamiento de estos DOTCs es importante la elección de la matriz sintética tridimensional para el cultivo de las CMM-MO. Este componente juega un papel fundamental en la adhesión, proliferación, y muerte celular (Shang F y cols., 2014). Además, ejercen una importante función en proporcionar un soporte mecánico que permita la máxima unión de CMM-MO, así como el depósito de la matriz ósea mineralizada posibilitando el suministro de nutrientes y oxígeno a las células (Rao RR y cols., 2013). Con el objetivo de lograr con éxito la osteoinducción a través de la ITO y lograr la regeneración de los DOTCs en los huesos maxilares, en las últimas décadas se han estudiado numerosos biomateriales usados como matrices. Las matrices empleadas en ITO se dividen en polímeros naturales y sintéticos, materiales inorgánicos que contienen proporciones variables de Ca/P y materiales compuestos (Ge Z y cols., 2008). Aunque, los polímeros tanto naturales como sintéticos son biorreabsorbibles, ellos presentan como principal desventaja que sus productos de degradación pueden provocar una reacción indeseada en el cuerpo humano (Burg KJ y cols., 2000). Por esta razón, se utilizan con más frecuencia las matrices basadas en materiales inorgánicos que contienen Ca/P, principalmente, los compuestos por 60% de HA y 40% de β -TCP; ya que, en estas BCs la presencia de HA retrasa la reabsorción de β -TCP, favoreciendo que la matriz se reabsorba más lentamente coincidiendo con el crecimiento tisular (Bansal R y cols., 2014). En nuestro estudio hemos usado una biocerámica (BC) bifásica porosa esterilizada compuesta por 60% de HA y un 40% de β -TCP con una granulometría desde los 180 a los 250 μ m. En estas BCs bifásicas la presencia de HA retrasa la reabsorción del β -TCP manteniendo el volumen tridimensional, sin afectar a sus propiedades osteoconductoras (Bansal R y cols., 2014). De este modo, la HA y el β -TCP pueden liberar activamente iones de Ca y P influyendo en la concentración iónica local, con el fin de proporcionar el medio adecuado para el depósito de calcio en la matriz, y así favorecer su posterior remodelación (Yang W y cols., 2014). La principal característica de estas BCs bifásicas es su capacidad para formar una unión directa y fuerte con el hueso hospedador, dando lugar a una sólida fase comparando con otros biomateriales que crean una fase fibrosa (Bansal R y cols., 2014).

El siguiente paso tras la selección de la matriz adecuada consiste en la elección de una fuente confiable de células que permita su aislamiento y propagación. Las CMMs son usadas como una alternativa viable para la regeneración de numerosos tejidos. Estas células son pluripotenciales y pueden, bajo determinadas condiciones, diferenciarse hacia diferentes linajes celulares como hueso, estructuras nerviosas, cartílago, grasa, piel, tendón, y músculo (Caplan y Bruder, 2001). Las fuentes más comunes para la obtención de CMMs son la médula ósea y el tejido adiposo.

En este sentido, pensamos que la BAB puede ser una rica fuente de CMM-A con un importante futuro en los tratamientos de DOTCs en el área maxilofacial usando técnicas de ITO mediante las construcciones de matrices de biocerámicas bifásicas con CMM-A de la BAB como células osteoprogenitoras lo cual requerirá una mínima incisión intraoral sólo con anestesia local originando así, una mínima morbilidad en el sitio donante (Farré-Guasch E y cols., 2010).

Este estudio proporciona una clara evidencia en todos los grupos (sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas-osteoporóticas) que los DOTCs tratados con BC + CMM-MO y con BC + CMM-A de la BAB muestran una gran unión ósea tanto radiológicamente demostrado mediante la densidad mineral ósea como histológica a través de las tinciones con Hem-Eos y azul de toluidina y una mayor positividad en FCEV y BMP-2, en comparación con aquellos DOTCs tratados únicamente con BC (a las 4 y 8 semanas). En cuanto al procedimiento terapéutico consistente en la implantación de BC + CMM-MO, cabe destacar que hasta la fecha, sólo ha sido publicado un artículo científico en el que compararon dos tipos de tratamiento (β -TCP sólo o β -TCP con CMM-MO) para la regeneración ósea de DOTCs usando el mismo modelo de DOTC en la sínfisis mandibular de rata. En este artículo publicado por Yagyuu y cols. (Yagyuu T y cols, 2015) en el año 2015; usaron un total de 60 ratas hembras Fisher 344 sanas que fueron aleatorizadas en dos grupos de tratamiento (n=30 por grupo): grupo 1 con β -TCP y grupo 2 con β -TCP + CMM-MOs. Sus resultados son muy similares a los obtenidos en nuestro estudio en el grupo 1 (ratas sanas) debido a que también observaron que en su único momento de estudio (8 semanas desde el tratamiento quirúrgico), las ratas cuyos DOTCs habían sido tratados con β -TCP + CMM-MO muestran una mayor unión ósea radiológica e histológica en comparación con DOTCs tratados con β -TCP sólo. En el año 2016 Ueyama y cols (Ueyama T y cols., 2016) usaron este modelo para analizar la

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

capacidad regenerativa de las CMM-MO sin el andamiaje de las matrices en comparación con los DOTCs sin tratar. Un total de 40 ratas Fisher 344 hembras sanas fueron aleatorizadas en dos grupos: grupo 1 CMM-MO (n=30) y grupo 2 sin tratamiento (n=10). Los resultados arrojados indicaron que en sus tres momentos de estudios (2, 4 y 8 semanas postoperatorias), las ratas cuyos DOTCs habían sido tratados con CMM-MO mostraron una mayor unión ósea radiológica e histológica. De hecho, a las dos semanas después de la implantación, las imágenes de micro-CT y las secciones histológicas demostraron cierto tejido de calcificación granular dentro del espacio óseo que conforma la sínfisis mandibular al legar el tejido fibroso. A las 4 semanas, el tejido de calcificación se extendió en el espacio de la sínfisis mandibular. A las 8 semanas, este nuevo tejido óseo en expansión estaba maduro. De este modo, el grupo experimental 1 (CMM-MO) mostró abundante tejido óseo nuevo pero no así en el grupo 2. Igualmente, el modelo animal de ratas sanas ha sido utilizado en diferentes estudios con abordaje extraoral para la creación de los DOTCs. Así, en el año 2013 Reddy y cols (Reddy S y cols., 2013) realizaron un estudio piloto sobre 12 ratas sanas Wistar hembras en las que crearon un DOTCs en su fémur aleatorizándolas en tres grupos de tratamiento: grupo 1 BC bifásica de HA + β -TCP con CMM-MO (n=3), grupo 2 BC bifásica (n=3), y grupo sin tratamiento (n=1). A los 3 meses después de la cirugía, los animales pertenecientes al grupo 1 mostraron una mayor regeneración ósea del DOTCs que el resto de grupos. Del mismo modo, en el año 2020 Paré y cols (Paré A y cols., 2020) crearon DOTCs de 5.5 mm de diámetro en la calota de 24 ratas sanas Lewis y posteriormente fueron tratados con discos impresos en 3-D de BC bifásica (HA + β -TCP) sola o combinados con CMM-MO. A las 7 semanas de la cirugía, los animales tratados con BC bifásica + CMM-MO mostraron en las imágenes de micro-CT un mayor volumen de hueso neoformado así como mayor formación histológica de hueso y vascularización del mismo mediante el análisis inmunohistoquímico de CD31.

Hasta la fecha, el uso de la ITO mediante la construcción de BC con CMM-BAB para la regeneración de sujetos sanos, osteoporóticos o diabéticos permanecen desconocidos.

En este sentido, la posibilidad de obtener CMM-A de la BAB con características similares a las CMM-A del tejido adiposo subcutáneo (CMM-SC), ha sido demostrado en varios estudios *in vitro*, tanto con el uso de células animales (Niada S y cols., 2013)

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

como humanas (Broccaioli E y cols., 2013). En el año 2013, Niada y cols (Niada S y cols., 2013) aislaron CMM-A del tejido adiposo subcutáneo interescapular y de la BAB de seis cerdos y concluyeron que las bolas adiposas de Bichat contenían células progenitoras con características mesenquimales y que se osteodiferenciaban positivamente con soporte sintético por lo que sugirieron que las CMM-BAB porcinas podrían ser utilizadas en la regeneración de defectos óseos maxilofaciales. En el mismo año, Broccaioli y cols (Broccaioli E y cols., 2013) compararon las características de las CMM-BAB con las CMM-SC. Ambas fuentes celulares mostraron una importante capacidad proliferativa y el típico inmunofenotipo de célula madre mesenquimal. Además, cuando estas células eran propiamente inducidas, los marcadores de diferenciación osteogénicos y adipogénicos tales como la actividad de la fosfatasa alcalina, la deposición de colágeno y la formación de vacuolas lipídicas fueron observados de manera temprana. Igualmente, se analizó el crecimiento tanto de CMM-SC como de CMM-BAB en plasma humano y su adhesión a matrices naturales y sintéticas. Ambas líneas celulares de diferentes fuentes mostraron una rápida adaptación al plasma humano autólogo o heterólogo, aumentando la tasa de proliferación en comparación con las condiciones de cultivo estándares y ambas líneas celulares se adhirieron al hueso, ligamento periodontal, membrana colágena y filamentos de sutura de ácido poliglicólico (presentes en la cavidad oral al ser ampliamente usados en cirugía oral). Así, los autores concluyeron que las BAB contienen CMM-A con características de células madre que pueden diferenciarse y adherirse a soportes biológicos y materiales sintéticos. Por estas razones, los investigadores propusieron las CMM-BAB para el uso en la ITO. Del mismo modo, Farré-Guasch y cols (Farré-Guasch E y cols., 2010) en el año 2010 analizaron la fracción vascular estromal (FVE) obtenida del tejido adiposo derivado de la BAB humana para detectar y cuantificar el porcentaje de CMM-A en este tejido. Los resultados demostraron que la BAB contenía una población de CMM-A con un fenotipo similar a las CMM-SC y que, igualmente, podían diferenciarse en un linaje condrogénico, adipogénico y osteogénico. De este modo, los autores definieron la BAB como una fuente nueva, accesible y rica en CMM-A para los procedimientos de la ITO en el área maxilofacial.

En relación, a los buenos resultados *in vivo* obtenidos en nuestro estudio al usar una BC compuesta por 60% HA/40% β -TCP como matriz para el cultivo de CMM-BAB, recientemente han sido publicado dos estudios *in vitro*, donde se investiga la proliferación

y diferenciación osteogénica de CMM-BAB cultivadas en HA (Hosseini FS y cols., 2019) o combinado con otros adyuvantes (Mahdavi R y cols., 2020). En el año 2019, Hosseini y cols (Hosseini FS y cols., 2019) compararon el potencial de diferenciación osteogénica al cultivar sobre una matriz de electrohilado de policaprolactona (PCL) revestido por HA tres células madre humanas diferentes: CMM-BAB, CMM-MO y células madre somáticas. La proliferación y diferenciación osteogénica de las CMM fueron investigadas mediante ensayos MTT, tinción con rojo Alizarin, actividad de la fosfatasa alcalina, contenido en calcio y estudios de expresión génica. De acuerdo a los resultados obtenidos y debido a su disponibilidad, facilidad de obtención y menor morbilidad para el paciente, los autores concluyeron que las CMM-BAB son una mejor opción que las CMM-MO y las células madre somáticas para su uso en la ITO. En el año 2020, Mahdavi y cols (Mahdavi R y cols., 2020) fabricaron una nueva matriz de gelatina sobre la cual cultivaron CMM-BAB. Del mismo modo, recurrieron a ensayos de MTT, actividad de fosfatasa alcalina y adhesión celular para evaluar la respuesta biológica *in vitro*. Los resultados demostraron un correcto crecimiento celular, así como una adecuada diferenciación osteogénica de las CMM-BAB sobre esta nueva estructura.

Aunque son escasos los estudios clínicos en humanos en los que se han usado las CMM-BAB para la regeneración ósea de defectos óseos maxilofaciales, en el año 2018, Khojasteh y cols (Khojasteh A y cols., 2019) realizaron un estudio clínico prospectivo, en el que evaluaron y compararon sobre 14 pacientes la eficacia de regenerar una atrofia posterior mandibular con CMM-BAB combinado con hueso bovino anorgánico al 50% o mediante hueso autólogo particulado concluyendo que la ITO usando CMM-BAB puede ser una alternativa a la reconstrucción con hueso autólogo de los defectos de la cresta alveolar. En el año 2019, Akhalaghi y cols (Akhalaghi F y cols., 2019) publicaron un artículo con 9 pacientes con defectos óseos aleatorizados en dos grupos de estudios; grupo 1: injertos de hueso de la cresta ilíaca recubierto con membrana amniótica humana (n=5) y grupo 2: injerto óseo de la cresta ilíaca recubierto con membrana amniótica humana cultivada con CMM-BAB (n=4). Cinco meses después del tratamiento con el injerto y antes de la colocación del implante, se realizó un análisis radiomorfológico mediante tomografía computarizada de haz cónico concluyendo que el uso de la membrana amniótica humana junto con CMM-BAB puede mejorar la regeneración ósea especialmente en la dimensión horizontal.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

En relación con nuestros buenos resultados obtenidos en la regeneración de DOTCs en animales con enfermedades sistémicas que afectan al metabolismo óseo tales como la diabetes o la osteoporosis; en el año 2020 Wang y cols (Wang L y cols., 2020) crearon DOTCs de 5 mm de diámetro en el hueso parietal de 16 ratas diabéticas Sprague-Dawley machos, aleatorizados en dos grupos de tratamiento: HA sola o HA junto con CMM-MO. En sus dos momentos de estudio (6 y 12 semanas) observaron radiológica e histológicamente que los DOTCs tratados con HA + CMM-MO obtuvieron una mayor densidad de hueso neoformado y con tendencia a conseguir una completa reparación del área del defecto, mientras que aquellos tratados únicamente con la BC compuesta por HA se obtuvo un hueso más fragmentado e intercalado con tejido de menor densidad (tejido fibroso). En relación con la regeneración ósea usando BC + CMM-MO en animales osteoporóticos, Lin y cols (Lin K y cols., 2013) realizaron un total de 12 DOTCs de 5 mm en la calota de 6 ratas osteoporóticas Fisher 344 hembras, los DOTCs fueron aleatorizados en dos grupos de tratamiento: grupo 1 consistente en cerámica porosa de silicato de calcio sustituida por estroncio (SrCs) y grupo 2 SrCs + CMM-MO. Después de 4 semanas de la operación se observó tejido óseo de nueva formación en los DOTCs tratados con SrCs + CMM-MO que aquellos con SrCs sola; obteniendo, además, DMO con diferencias estadísticamente significativas.

Debemos resaltar de los resultados obtenidos en nuestros cuatro grupos experimentales, la gran capacidad osteogénica observada en los DOTCs del grupo 4 (ratas diabéticas con osteoporosis) puesto que en este tipo de pacientes se produce un efecto sinérgico de ambas enfermedades que impide la regeneración ósea de los DOTCs con el uso exclusivo de biomateriales (Mohsin S y cols., 2019) por lo que la ITO (como se observa en nuestros resultados) puede permitir la correcta regeneración ósea de estas pérdidas óseas de gran tamaño en condiciones tan desfavorables. Además, los buenos resultados de esta técnica *in vivo* permanecían desconocidos hasta ahora para este tipo de pacientes. No obstante, esta característica tan innovadora de nuestro estudio también supone una de las principales limitaciones de nuestra investigación: el impedimento de poder comparar nuestros resultados con otros publicados hasta la fecha. Es así como nuestro estudio constituye la primera investigación para comparar la formación de nuevo hueso en DOTCs en la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas,

diabéticas-osteoporóticas mediante el tratamiento de BCs con o sin CMM-MO y de BCs con o sin CMM-A.

VI.CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El estudio mediante micro-CT de la unión ósea radiológica en todos los grupos de estudio (sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis) indicó puntuaciones más altas en los DOCTs de la sínfisis mandibular de ratas tratadas con BCs + CMM-BAB, seguidos de los DOCTs tratados con BCs + CMM-MO y por último los tratados con BCs exclusivamente; tanto a las 4 como a las 8 semanas de tratamiento.

2. La DMO fue mayor en todos los grupos de estudio (sanas, diabéticas, osteoporóticas, y diabéticas con osteoporosis) en los DOCTs de la sínfisis mandibular de ratas tratadas con BCs + CMM-BAB, seguidos de los DOCTs tratados con BCs + CMM-MO y por último los tratados con BCs exclusivamente; tanto a las 4 como a las 8 semanas de tratamiento.

3. La unión ósea histológica mostró puntuaciones más altas en los DOCTs de la sínfisis mandibular de ratas tratadas con BCs + CMM-BAB, seguidos de los DOCTs tratados con BCs + CMM-MO y por último los tratados con BCs exclusivamente; tanto a las 4 como a las 8 semanas de tratamiento, en todos grupos de estudio (sanas, diabéticas, osteoporóticas, y diabéticas con osteoporosis).

4. El análisis inmunohistoquímico de FCEV indicó en todos los grupos de estudio (sanas, diabéticas, osteoporóticas, y diabéticas con osteoporosis), una mayor inmunopositividad en los DOCTs de la sínfisis mandibular de ratas tratadas con BCs + CMM-BAB, seguidos de los DOCTs tratados con BCs + CMM-MO y por último los tratados con BCs exclusivamente; tanto a las 4 como a las 8 semanas de tratamiento.

5. En todos los grupos de estudio (sanas, diabéticas, osteoporóticas, y diabéticas con osteoporosis), el análisis inmunohistoquímico de BMP-2 indicó una mayor inmunopositividad en los DOCTs de la sínfisis mandibular de ratas tratadas con BCs + CMM-BAB, seguidos de los DOCTs tratados con BCs + CMM-MO y por último los tratados con BCs exclusivamente; tanto a las 4 como a las 8 semanas de tratamiento.

6. Tanto a las 4 como a las 8 semanas de tratamiento, los DOCTs tratados con BCs + CMM-BAB mostraron una mayor unión ósea radiológica, DMO, unión ósea histológica, e inmunopositividad de FCEV y BMP-2, que los tratados con BCs + CMM-MO en todos los grupos de estudio (sanas, diabéticas, osteoporóticas, y diabéticas con osteoporosis); sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

VII.BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Gallegos M, Figueiredo R, Rodríguez-Baeza A, Gay-Escoda C. Use of Bichat's buccal fat pad for the sealing of orosinual communications. A presentation of 8 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16:215-19.
- Adam S, DeConde MD, Lee ML, Sidell D, Aghaloo T, Lee M, et al. Defining the critical-sized defect in a rat segmental mandibulectomy model. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014; 140:58-65.
- Akesson A, Grynblas MD, Hancock RGV, Odselius R, Obrant KJ. Energy-dispersive X-ray microanalysis of the bone mineral content in human trabecular bone: a comparison with ICPEs and Neutron activation analysis. *Calcif Tissue Int* 1994; 55:236-9.
- Akhalaghi F, Hesami N, Rad MR, Nazeman P, Fahimipour F, Khojasteh A. Improved bone regeneration through amniotic membrane loaded with buccal fat pad-derived MSCs as an adjuvant in maxillofacial reconstruction. *J Craniomaxillofac Surg* 2019; 47:1266-73.
- Alonso-González R, Peñarrocha-Diago M, Peñarrocha-Oltra D, Aloy-Prósper A, Camacho-Alonso F, Peñarrocha-Diago M. Closure of oroantral communications with Bichat's buccal fat pad. Level of patient satisfaction. *J Clin Exp Dent* 2015; 7:28-33.
- Ardura JA, Portal-Nuñez S, Lozano D, Gutierrez-Rojas I, Sanchez-Salcedo S, López-Hernandez A et al. Local delivery of parathyroid hormone-related protein-derived peptides coated onto a hydroxyapatite-based implant enhances bone regeneration in old and diabetic rats. *J Biomed Mater Res A* 2016; 104:2060-70.
- Arias-Diaz J, Balibrea J. Modelos de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo-2. *Nutr Hosp* 2007; 22:160-68.
- Asatrian G, Pham D, Hardy WR, James AW, Peault B. Stem cell technology for bone regeneration: current status and potential applications. *Stem Cells Cloning* 2015; 8:39-48.

- Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, allograft, and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery. *J Orthop Trauma* 2019; 33:203-13.
- Bansal R, Patil S, Chaubey KK, Thakur RK, Goyel P. Clinical evaluation of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate composite graft in the treatment of intrabony periodontal defect: a clinico-radiographic study. *J Indian Soc Periodontol* 2014; 18: 610-17.
- Barbirato DDS, Fogacci MF, Gusman H, Takiya CM, Carvalho DP, Samsone C. Hydroxyapatite calvaria graft repair in experimental diabetes mellitus in rats. *J Craniomaxillofac Surg* 2018; 46:1576-85.
- Barry M, Pearce H, Cross L, Tatullo M, Gaharwar AK. Advances in Nanotechnology for the Treatment of Osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2016; 14:87-94.
- Betsch M, Schneppendahl J, Thuns S, Hertel M, Sager M, Jungbluth P, et al. Bone marrow aspiration concentrate and platelet rich plasma for osteochondral repair in a porcine osteochondral defect model. *PLoS ONE* 2013; 8:716-22.
- Binderman I, Yaffe A, Zohar R, Benayahu D, Bahar H. Tissue engineering of bone: an ectopic rat model. *Front Biosci* 2011; 3:61-68.
- Bornes TD, Adesida AB, Jomha NM. Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review. *Arthritis Res Ther* 2014; 16:432.
- Bouler JM, Pilet P, Gauthier O, Verron E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomater* 2017; 53:1-12.
- Bow A, Anderson DE, Dhar M. Commercially available bone graft substitutes: the impact of origin and processing on graft functionality. *Drug Metab Rev* 2019; 51:533-44.
- Broccaioli E, Niada S, Rasperini G, Ferreira LM, Arrigoni E, Yenagi V, et al. Mesenchymal Stem Cells from Bichat's Fat Pad: In Vitro Comparison with Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous Tissue. *Biores Open Access* 2013; 2:107-17.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

- Burg KJ, Porter S, Kellan JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21:2347-59.
- Buurman DJM, Speksnijder CM, de Groot RJ, Kessler P, Rieger JM. Mastication in maxillectomy patients: A comparison between reconstructed maxillae and implant supported obturators: A cross-sectional study. *J Oral Rehabil* 2020; 47:1171-77.
- Camacho-Alonso F, Davia-Peña RS, Vilaplana-Vivo C, Tudela-Mulero MR, Merino JJ, Martínez-Beneyto Y. Synergistic effect of photodynamic therapy and alendronate on alveolar bone loss in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontal Res* 2018; 53:306-14.
- Camacho-Alonso F, Martínez-Ortiz C, Plazas-Buendía L, et al. Bone union formation in the rat mandibular symphysis using hydroxyapatite with or without simvastatin: effects on healthy, diabetic, and osteoporotic rats. *Clin Oral Investig* 2020; 24:1479-91.
- Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21 st century. *Trends Mol Med* 2001; 7:259-64.
- Carvalho FR, Calado SM, Silva GA, Diogo GS, Moreira da Silvas J, Rei RL, et al. Altered bone microarchitecture in a type 1 diabetes mouse model Ins2Akita. *J Cell Physiol* 2019; 234:9338- 50.
- Carpentier VT, Wong J, Yeap Y, Gan C, Sutton-Smith P, Badiei A, et al. Increased proportion of hypermineralized osteocyte lacunae in osteoporotic and osteoarthritic human trabecular bone: implications for bone remodeling. *Bone* 2012; 50:688-94.
- Cheng N, Wang Y, Zhang Y, Shi B. The osteogenic potential of mesoporous bioglasses/silk and non-mesoporous bioglasses/silk scaffolds in ovariectomized rats: in vitro and in vivo evaluation. *PLOS ONE* 2013; 8:810-14.
- Costa D, Prowse PD, Chrones T, Sims SM, Hamilton DW, Rizkalla AS, et al. The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings. *Biomaterials* 2013; 34:7215-26.

- Cuervas-Monsa M, Narbonaa J, Lagunaa R, Vaqueroa J. Implante de concentrado de médula ósea autógeno en el tratamiento de la necrosis isquémica de cabeza femoral: evolución clínica al segundo año de seguimiento de un estudio prospectivo no controlado. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol* 2013; 57:106-10.
- Deng Y, Bi X, Zhou H, You Z, Wang Y, Gu P, et al. Repair of critical-sized bone defects with anti-mir-3 expressing bone marrow stromal stem cells and poly (glycerol sebacate) scaffolds. *Eur Cells Mater* 2014; 27:13-25.
- Donghyun L, Dong NH, Han-Jun K, Wan-Kyu K, Sang JL, Min H. Inhibition of Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by Bisphosphonate conjugated Gold Nanoparticles. *Sci Rep* 2016; 6:1-11.
- Eap S, Keller L, Schiavi J, Huck O, Jacomine L, Fioretti F, et al. A living thick nanofibrous implant bifunctionalized with active growth factor and stem cells for bone regeneration. *Int J Nanomedicine* 2015; 10:1061–75.
- Ejiri S, Tanaka M, Watanabe N, Binte-Anwar R, Yamashita E, Yamada K, et al. Estrogen deficiency and its effect on the jaw bones. *J Bone Miner Metab* 2008; 26:409-15.
- Ekizer A, Yalvac ME, Uysal T, Sonmez MF, Sahin F. Bone marrow mesenchymal stem cells enhance bone formation in orthodontically expanded maxillae in rats. *Angle Orthod* 2014; 85:394-9.
- Eldesoq K, Henrich D, El-Kady AM, Arbid MS, El-Hady BM, Marzi I, et al. Safety evaluation of a bioglass–polylactic acid composite scaffold seeded with progenitor cells in a rat skull critical-size bone defect. *PLOS ONE* 2014; 9:8764-72.
- Epstein S, Defeudis G, Manfrini S, Napoli N, Pozzilli P. Diabetes and disordered bone metabolism (diabetic osteodystrophy): time for recognition. *Osteoporos Int* 2016; 27: 1931-51.
- Ezirganlı Ş, Kazancıoğlu HO, Mihmanlı A, Aydın M Ş, Sharifov R, Alkan A. The effect of local simvastatin application on critical size defects in the diabetic rats. *Clin Oral Implants Res* 2014; 25:969-76.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

- Farré-Guasch E, Martí-Pagès C, Hernández-Alfaro F, Klein-Nulend J, Casals N. Buccal fat pad, an oral access source of human adipose stem cells with potential for osteochondral tissue engineering: an in vitro study. *Tissue Eng* 2010; 16:1083-94.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. Osteogenic stem cells in bone marrow. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3:393-403.
- Fujimaki S, Machida M, Hidaka R, Asashima M, Takemasa T, Kuwabara T. Intrinsic ability of adult stem cell in skeletal muscle: an effective and replenishable resource to the establishment of pluripotent stem cells volumen. *Stem Cells Int* 2013; 2013:4201-64.
- Gadelkarim M; Abushouk AI; Ghanem E; Hamaad AM; Saad AM; Abdel-Daim MM. Adipose-derived stem cells: Effectiveness and advances in delivery in diabetic wound healing. *Biomed Pharmacother* 2018; 107:625-33.
- Gallinetti S, Canal C, Ginebra MP. Development and characterization of biphasic hydroxyapatite/ b-TCP cements. *J Am Ceram Soc* 2014; 97:1065-73.
- Gamblin LA, Brennan MA, Renaud A, Yagita H, Lezot F, Heymann D, et al. Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages. *Biomaterials* 2014; 35:9660-67.
- Garai S, Sinha A. Biomimetic nanocomposites of carboxymethylcellulose–hydroxyapatite: novel three dimensional load bearingbone grafts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014; 115:182-90.
- Gardel S, Serra LA, Reis RL, Gomes ME. Use of Perfusion Bioreactors and Large Animal Models for Long Bone Tissue Engineering. 2014; 20:126-46.
- Ghamor-Amegavi EP, Xianyan Y, Jia F, Zhijun P, Chen Z, Xiurong K, et al. Yolk-porous shell biphasic bioceramic granules enhancing bone regeneration and repair beyond homogenous hybrid. *Mater Sci Eng C* 2019; 433-34.
- Ge Z, Jin Z, Cao T. Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration. *Biomed Mater* 2008; 3:022001.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

- Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003; 88:873-84.
- Giannoudis P, Einhorn T, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Inj Prev* 2007; 38:3-6.
- Gomes MF, Valva VN, Vieira EM, Giannasi LC, Salgado MA, Vilela-Goulart MG. Homogenous demineralized dentin matrix and platelet-rich plasma for bone tissue engineering in cranioplasty of diabetic rabbits: biochemical, radiographic, and histological analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2016; 45:255-66.
- Gordeladze JO, Reseland JE, Duroux-Richard I, Apparailly F, Jorgensen C. From Stem Cells to Bone: Phenotype Acquisition, Stabilization and Tissue Engineering in Animal Models. *ILAR J.* 2010; 51:42-61.
- Gosain Ak, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold IL, et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGB-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg* 2000; 106:360-71.
- Gothard D, Smith EL, Kanczler JM, Rashidi H, Qutachi O, Henstock J, et al. Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur Cell Mater* 2014; 28:166-207.
- Grassmann JP, Schnependahl J, Sager M, Hakimi AR, Herten M, Loegters TT, et al. The effect of bone marrow concentrate and hyperbaric oxygen therapy on bone repair. *J Mater Sci Mater Med* 2015; 26:5331.
- Hamann C, Kirschner S, Güntherc KP, Hoybauer LC. Bone, sweet bone-osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8:297-305.
- Hamini M, Grassmann JP, Betsch M, Schnependahl J, Gehrman S, Hakimi AR, et al. The composite of bone marrow concentrate and PRP as an alternative to autologous bone grafting. *PLOS ONE* 2014; 9:1001-43.

- Hashemibeni B, Esfandiari E, Sadeghi F, Heidary F, Roshankhah S, Mardani M, et al. An animal model study for bone repair with encapsulated differentiated osteoblasts from adipose-derived stem cells in alginate. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17:854-9.
- Hendrich C, Franz E, Waertel G, Krebs R, Jäger M. Safety of autologous bone marrow aspiration concentrate transplantation: initial experiences in 101 patients. *Orthop Rev* 2009; 1:32.
- Ho-Pham LT, Chau PMN, Do AT, Nguyen HC, Nguyen TV. Type 2 diabetes is associated with higher trabecular bone density but lower cortical bone density: the Vietnam Osteoporosis Study. *Osteoporosis Int* 2018; 29:2059-67.
- Hong B, Lee S, Shin N, Ko Y, Kim Dw, Lee Ju, et al. Bone regeneration with umbilical cord blood mesenchymal stem cells in femoral defects of ovariectomized rats. *Osteoporosis Sarcopenia* 2018; 4:95-101.
- Hongshi M, Chun F, Jiang C, Chengtie W. 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy. *Acta Biomater* 2018; 79:37-59.
- Hosseini FS, Soleimanifar F, Ardeshtyrlajimi A, Vakilian S, Mossahebi-Mohammadi M, et al. In vitro osteogenic differentiation of stem cells with different sources on composite scaffold containing natural bioceramic and polycaprolactone. *Artic Cells Nanomed Biocethnol* 2019; 47:300-07.
- Ikeuchi M, Dohi Y, Horiuchi K, Ohgushi H, Noshi T, Yoshikawa T, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes osteogenesis within atelopeptide type I collagen solution by combination with rat cultured marrow cells. *J Biomed Mater Res* 2002; 60:61-9.
- Jafarian M, Baughman-Eslaminejad MB, Khojasteh A, Mashhadi Abbas F, Dehghan MM, Hassanizadeh R, et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells directed bone regeneration in the dog mandible: comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105:14-24.

- Jager M, Jelinek EM, Wess KM, Scharfstädt A, Jacobson M, Kevy SV, et al. Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009; 4:34-43.
- Jain R, Kaur H, Jain S, Kapoor D, Nanda T, Jain M. Comparison of nano-sized hydroxyapatite and b tricalcium phosphate in the treatment of human periodontal intrabony defects. *J Clin Diagn Res* 2014; 8:74-78.
- Jeon OH, Elisseeff J. Orthopedic tissue regeneration: cells, scaffolds, and small molecules. *Drug Deliv Transl Res* 2016; 6:105-20.
- Jia P, Chen H, Kang H, Qi J, Zhao P, Jiang M, et al. Deferoxamine released from poly (lactic-co-glycolic acid) promotes healing of osteoporotic bone defect via enhanced angiogenesis and osteogenesis. *J Biomed Mater Res A* 2016; 104:2515-27.
- Jiang H, Cheng P, Li D, Li J, Wang J, Gao Y, et al. Novel standardized massive bone defect model in rats employing an internal eight-hole stainless steel plate for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12:2162–71.
- Jin Q, Yuan K, Lin W, Niu C, Ma R, Huang Z. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019; 47:1577-84.
- Jung YJ, Kim R, Ham HJ, Park SI, Lee MY, Kim J, Hwang J, et al. Focused low-intensity pulsed ultrasound enhances bone regeneration in rat calvarial bone defect through enhancement of cell proliferation. *Ultrasound Med Biol* 2015; 41:999-1007.
- Kalaszczynska I, Ruminski S, Platek AE, Bissenik I, Zakrzewski P, Noszczyk M, et al. Substantial differences between human and ovine mesenchymal stem cells in response to osteogenic media: how to explain and how to manage? *Biores Open Access* 2013; 2:356-63.
- Karim L, Moulton J, Van-Vliet M, Velie K, Robbins A, Malekipour F, et al. Bone microarchitecture, biomechanical properties, and advanced glycation end-products in the proximal femur of adults with type 2 diabetes. *Bone* 2018; 114:32-39.

- Kerschman-Schindl K. Prevention and rehabilitation of osteoporosis. Wien Med Wochenschr 2016; 166:22-7.
- Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Development, in vitro and in vivo characterization of zoledronic acid functionalized hydroxyapatite nanoparticle based formulation for treatment of osteoporosis in animal model. Eur J Pharm 2015; 66:173-83.
- Khojasteh A, Hosseinpour S, Rezai Rad M, Alikhasi M, Zadeh HH. Buccal fat pad-derived stem cells with anorganic bovine bone mineral scaffold for augmentation of atrophic posterior mandible: An exploratory prospective clinical study. Clin Implant Dent Relat Res 2019; 21:292-300.
- Kiernan J, Hu S, Grynopas MD, Davies JE, Stanford WL. Systemic Mesenchymal Stromal Cell Transplantation Prevents Functional Bone Loss in a Mouse Model of Age-Related Osteoporosis- Stem Cells Transl Med 2016; 5:1-11.
- Kim H, Amirthalingam S, Kim SL, Lee SS, Rangasamy J, Hwang NS. Biomimetic materials and fabrication approaches for bone tissue engineering. Adv Healthcare Mater 2017; 6:1700612-30.
- Kim JM, Son JS, Kang SS, Kim G, Choi SH. Bone Regeneration of Hydroxyapatite/Alumina Bilayered Scaffold with 3mm Passage-Like Medullary Canal in Canine Tibia Model. BioMed Res Int 2015; 2015:2351-08.
- King AJ. The use of animal models in diabetes research. Br J Pharmacol 2012; 166:877-94.
- Klíma K, Vaněček V, Kohout A, Jiroušek O, Foltán R, Štulík J, Machoň V, Pavlíková G, Jendelová P, Syková E, Šedý J. Stem cells regenerative properties on new rat spinal fusion model. Physiol Res 2015; 64:119-28.
- Lee JH, Ryu MY, Baek HR, Lee KM, Seo JH, Lee HK. Fabrication and evaluation of porous beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite (60/40) composite as a bone graft extender using rat calvarial bone defect model. ScientificWorldJournal 2013; 2013:4817-89.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

- Lee LT, Kwan PC, Chen YF, Wong YK. Comparison of the effectiveness of autologous fibrin glue and macroporous biphasic calcium phosphate as carriers in the osteogenesis process with or without mesenchymal stem cells. *J Chin Med Assoc* 2008; 71:66-73.
- Lekkala S, Taylor EA, Hunt HB, Donnelly E. Effects of Diabetes on Bone Material Properties. *Curr Osteoporos Rep* 2019; 6:455-64.
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 2008; 58:424-30.
- Li K, Xie Y, You M, Huang L, Zheng X. Plasma sprayed cerium oxide coating inhibits H₂O₂-induced oxidative stress and supports cell viability. *J Mater Sci Mater Med* 2016; 27:100.
- Liao L, Yang S, Miron RJ, Wei J, Zhang Y, Zhang M. Osteogenic properties of PBLG-g-HA/PLLA nanocomposites. *Plos One* 2014; 9: 1058-76.
- Liao SY, Tse HF. Multipotent (adult) and pluripotent stem cells for heart regeneration: what are the pros and cons? *Stem Cell Res Ther* 2013; 4:151.
- Li-Ru C, Nai-Yu K, Kuo-Hu C. Medical treatment for osteoporosis: from molecular TO clinical opinions. *Int J Mol* 2019; 20:2213-34.
- Lin K, Xia L, Li H. Enhanced osteoporotic bone regeneration by strontium-substituted calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials* 2013; 34:10028-42.
- Ling-Ling E, Wen-Huan X, Feng L, Liu Y, Dong-Qing C, Wen N et al. Estrogen enhances the bone regeneration potential of periodontal ligament stem cells derived from osteoporotic rats and seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Int J Mol Med* 2016; 37:1475-86.
- Liu Y, Sun X, Yu J, Wang J, Zhai P, Chen S, et al. Platelet-rich fibrin as a bone graft material in oral and maxillofacial bone regeneration: classification and summary for better application. *Biomed Res Int* 2019; 2019:1-16.

- Liu Y, Zhang XL, Chen L, Lin X, Xiong D, Xu F, et al. Epigenetic mechanisms of bone regeneration and homeostasis. *Biophys Mol Biol* 2016: 1-8.
- Liu Z, Zhou W, Tangl S, Liub S, Xu X, Rausch-Fan X. Potential mechanism for osseointegration of dental implants in Zucker diabetic fatty rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2015; 53:748-53.
- Ma L, Aijima R, Hoshino Y, Yamaza H, Tomoda E, Tanaka Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells ameliorates secondary osteoporosis through interleukin-17-impaired functions of recipient bone marrow mesenchymal stem cells in MRL/lpr mice. *Curr Stem Cell Res Ther* 2015; 6:105.
- Mahdavi R, Belgheisi G, Haghbin-Nazarpak M, Omidi M, Khojasteh A, Solati-Hashjin M. Bone tissue engineering gelatin-hydroxyapatite/graphene oxide scaffolds with the ability to release vitamin D: fabrication, characterization, and in vitro study. *Sci Mater Med* 2020; 31:97.
- Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Christou C, Walsh WR. A sheep model for cancellous bone healing. *Front Surg* 2014; 1:37.
- Mardas N, Buseti J, Poli-Figueiredo JA, Mezzomo LA, Kochenberger R, Donos SN. Guided bone regeneration in osteoporotic conditions following treatment with zoledronic acid. *Clin Oral Impl Res* 2016: 1-10.
- Mariano ED, Teixeira MJ, Nagahashi SK, Lepski G. Adult stem cells in neural repair: current options, limitations and perspectives. *World J Stem Cells* 2015; 7:477-82.
- Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011; 42:551-55.
- Martinez-Reina J, Pivonka P. Effects of long-term treatment of denosumab on bone mineral density: insights from an in-silico model of bone mineralization. *Bone* 2019; 145:87-95.
- Meseguer-Olmo L, Aznar-Cervantes S, Mazón P, De Aza PN. "In vitro" behaviour of adult mesenchymal stem cells of human bone marrow origin seeded on a novel bioactive ceramics in the Ca₂SiO₄-Ca₃(PO₄)₂ system. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23:3003-14.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

- Millan C; Vivanco JF; Benjumeda-Wijnhoven IM; Bjelica S; Santibanez JF. Mesenchymal Stem Cells and Calcium Phosphate Bioceramics: Implications in Periodontal Bone Regeneration. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1107:91-112
- Mohsin S, Baniyas MM, AlDarmaki RS, Tekes K, Kalász H, Adeghate EA. An update on therapies for the treatment of diabetes-induced osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther* 2019; 19:937-48.
- Moradi SL, Golchin A, Hajishafieha Z, Khani MM, Ardeshiryajimi A. Bone tissue engineering: Adult stem cells in combination with electrospun nanofibrous scaffolds. *J Cell Physiol* 2018; 10:6509-22.
- Morgan EF, Unnikrisnan GU, Hussein AI. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States *Annu Rev Biomed Eng* 2018; 20: 119-43.
- Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The Design and Use of Animal Models for Translational Research in Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Eng* 2010; 16:123-44.
- Niada S, Ferreira LM, Arrigoni E, Addis A, Campagnol M, Croccaioli E, et al. Porcine adipose-derived stem cells from buccal fat pad and subcutaneous adipose tissue for future preclinical studies in oral surgery. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4:148.
- Offermanns V, Zoffmann-Andersen O, Riede G, Hald-Andersen I, Pagh-Almtoft K, Sorensen S, et al. Bone regenerating effect of surface-functionalized titanium implants with sustained-release characteristics of strontium in ovariectomized rats. *Int J Nanomedicine* 2016; 11:2431-42.
- Ohnishi F, Ochiai H, Kishi K. Concentration of rat bone marrow nucleated cells using hypo-osmotic hemolysis in distilled water. *Reconstr Surg Glob Open* 2014; 2:184.
- Okata H, Nakamura M, Henmi A, Yamaguchi S, Mikami Y, Shimauchi H, et al. Calcification during bone healing in a standardized rat calvarial defect assessed by microCT and SEM-EDX. *Oral Dis* 2015; 21:74-82.
- Oliveira GR, Vargas-Sanchez PK, Fernandes RR, Tavares-Ricoldi MS, Semeghini MS, Pitol DL, et al. Lycopene influences osteoblast functional activity and prevents

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

- femur bone loss in female rats submitted to an experimental model of osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2019; 37:658-67.
- Ortiz Moura Fideles S, Cassia Ortiz A, Freire Assis A, Jordan Duarte M, Singaretti Oliveira F, Aleixo Passos G, et al. Effect of cell source and osteoblast differentiation on gene expression profiles of mesenchymal stem cells derived from bone marrow or adipose tissue. *J Cell Biochem* 2019; 120:11842-52.
 - Osagle-Clouard L, Sanghani-Kerai A, Coathup M, Meeson R, Briggs T, Blunn G. The influence of parathyroid hormone 1-34 on the osteogenic characteristics of adipose- and bone-marrow-derived mesenchymal stem cells from juvenile and ovariectomized rats. *Bone Joint Res* 2019; 8:397-404.
 - O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 1:79-84.
 - Paolucci T, Saraceni VM, Piccinini G. Management of chronic pain in osteoporosis: challenges and solutions. *J Pain Res* 2016; 9:177-86.
 - Paré A, Charbonnier B, Tournier P. Tailored Three-Dimensionally Printed Triply Periodic Calcium Phosphate Implants: A Preliminary Study for Craniofacial Bone Repair. *ACS Biomater Sci Eng* 2020; 6:553-63.
 - Pei M, Li J, McConda DB, Wen S, Clovis NB, Danley SS. A comparison of tissue engineering based repair of calvarial defects using adipose stem cells from normal and osteoporotic rats. *Bone* 2015; 78:1-10.
 - Permuy M, Lopez-Pena M, Muñoz F, Gonzalez-Cantalapiedra A. Rabbit as model for osteoporosis research. *J Bone Miner Metab* 2019; 37:573-83.
 - Petri M, Namazian A, Wilke F, Ettinger M, Stübiger T, Brand S, et al. Repair of segmental long-bone defects by stem cell concentrate augmented scaffolds: a clinical and positron emission tomography - computed tomography analysis. *Int Orthop* 2013; 37:2231-7.

- Pisani P, Renna MD, Conversano F, Casciaro E, Di-Paola M, Quarta E et al. Major osteoporotic fragility fractures: Risk factor updates and societal impact. *World J Orthop* 2016; 7:171-81.
- Pilia M, Guda T, Appleford M. Development of composite scaffolds for load-bearing segmental bone defects. *BioMed Res Int* 2013; 2013:4582-653.
- Pinheiro FA, Mourão CF, Diniz VS, Silva PC, Meirelles L, Santos Junior E, Schanaider A. In-vivo bone response to titanium screw implants anodized in sodium sulfate. *Act Cir Bras* 2014; 29:376-82.
- Qian C, Zhu C, Yu W, Jiang X, Zhang F. High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats Impacts Osteogenesis and Wnt Signaling in Bone Marrow Stromal Cells. *PLOS ONE* 2015; 10:e0136390.
- Qiu X, Jin X, Shao Z, Zhao X. 17β -Estradiol induces the proliferation of hematopoietic stem cells by promoting the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tohoku J Exp Med* 2014; 233:141-48.
- Rameshwar R, Rao R, Stegemann JP. Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytotherapy* 2015; 15:1309-22.
- Reddy S, Wasnik S, Guha A, Maleshe Kumar J, Sinha A, Singh S. Evaluation of nano-biphasic calcium phosphate ceramics for bone tissue engineering applications: in vitro and preliminary in vivo studies. *J Biomater Appl* 2013; 27:565-75.
- Romagnoli C, Brandi ML. Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering. *World J Stem Cells* 2014; 6:144-52.
- Roseti V, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, et al. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C* 2017; 78:1246-62.
- Salked SL, Patron LP, Barrack RL, Cook SD. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *J Bone Joing Surg Am* 2001; 83:803-16.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

- Saralaya S, Desai AK, Glosch R. Buccal fat pad in cleft palate repair- An institutional experience of 27 cases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2020; 137:110218.
- Sasaki T, Debari K, Garant PR. Ameloblast modulation and changes in the Ca, P, and S content of developing enamel matrix as revealed by SEM-EDX. *J Dent Res* 1987; 66:778-86.
- Schaumann P, Lindhorst D, Kampmann A, Gellrich NC, Krone-Wolf S, Lindenberg AM. Decelerated vascularization in tissue-engineered constructs in association with diabetes mellitus in vivo. *J Diabetes Complications* 2015; 29:855-64.
- Schwartz F, Herten M, Ferrari D. Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxyapatite + tricalcium phosphate (Bone Ceramic) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen): an immunohistochemical study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36:1198-1206.
- Shang F, Ming L, Zhou Z, Yu Y, Sun J, Ding Y, et al. The effect of licochalcone A on cell-aggregates ECM secretion and osteogenic differentiation during bone formation in metaphyseal defects in ovariectomized rats. *Biomaterials* 2014; 35:2789-97.
- Shanbhag S, Suliman S, Pandis N, Stavropoulos A, Sanz M, Mustafa K. Cell therapy for orofacial bone regeneration: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2019; 46:162-82.
- Shen Y, Guo S, Chen G, Ding Y, Wu Y, Tian W. Hyperglycemia induces osteoclastogenesis and bone destruction through the activation of ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *Calcif Tissue Int* 2019; 104:390-401.
- Shyng, YC, Devlin H, Sloan P. The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30:70-4.
- Song SH, Yun YP, Kim HJ, Park K, Kim SE, Song RH. Bone formation in a rat tibial defect model using carboxymethyl cellulose/BioC/bone morphogenic protein-2 hybrid materials. *BioMed Res Int* 2014; 2014:2301-52.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

- Song Z, Wu S, Sun S, Li H, Wang D, Gong J, et al. Quantitative analysis of factors influencing tissue-engineered bone formation by detecting the expression levels of alkaline phosphatase and bone γ -carboxyglutamate protein 2. *Exp Ther Med* 2015; 9:1097-102.
- Stramandinoli-Zanicotti RT, Carvalho AL, Rebelatto CL, Sassi LM, Torres MF, Senegaglia AC, et al. Brazilian minipig as a large-animal model for basic research and stem cell-based tissue engineering. Characterization and in vitro differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Appl Oral Sci* 2014; 22:218-27.
- Streckbein P, Meier M, Kähling C, Wilbrand JF, Langouth T, Schaaf H, et al. Donor-site Morbidity after Retromolar Bone Harvesting Using a Standardised Press Fit Cylinder Protocol. *Materials (Basel)* 2019; 19:3802.
- Sun Y, Ye X, Cai M, Liu X, Xiao J, Zhang C et al. Osteoblast-Targeting-Peptide Modified Nanoparticle for siRNA/microRNA Delivery. *Acs Nano* 2016.
- Rao RR, Stefemann JP. Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytotherapy* 2013; 15:1309-22.
- Takahashi T, Watanabe T, Nakada H, Tanimoto Y, Kimoto S, Mijares DQ. Effect of dietary supplement on periimplant bone strength in a rat model of osteoporosis. *J Prosthodont Res* 2016; 312:1-7.
- Tanaka S. Molecular understanding of pharmacological treatment of osteoporosis. *Effort Open Rev* 2019; 4:158-64.
- Tando T, Sato Y, Miyamoto K, Morita M, Kobayashi T, Funayama A et al. Hif1a is required for osteoclast activation and bone loss in male osteoporosis. *Biochem Biophys Res* 2016; 470:391-96.
- Tao ZS, Bai BL, He XW, Liu W, Li H, Zhou Q, et al. A comparative study of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant's osseointegration for osteopenic rats. *Med Biol Eng Comput* 2016; 54:1959-68.

- Tebar-Massó FJ, Escobar-Jiménez F. La diabetes mellitus en la práctica clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana 2009: 3-7.
- Tolstunov L, Hamrick JFE, Broumand V, Shilo D, Rachmiel A. Bone augmentation techniques for horizontal and vertical alveolar ridge deficiency in oral implantology. Oral Maxillofac Surg Clin North Am 2019; 31:163-91.
- Torres J, Lopes A, Lopes LA, Gutierrez M, Cabral AT, Fernandes MH, et al. The benefit of a human bone marrow stem cells concentrate in addition to an inorganic scaffold for bone regeneration: an in vitro study. BioMed Res Int 2015; 2015:2406-98.
- Torres-Torrillas M, Rubio M, Damia E, Cuervo B, Del Romero A, Peláez P et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Promising Tool in the Treatment of Musculoskeletal Diseases. Int J Mol Sci 2019; 20:3105.
- Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. Circ Res 2008; 102:77-85.
- Tsuji W, Rubin P, Marra KG. Adipose-derived stem cells: implications in tissue regeneration. World J Stem Cells 2014; 6:312-21.
- Ueyama T, Yagyuu T, Maeda M, Imada M, Akahane M, Kawate K, et al. Maxillofacial bone regeneration with osteogenic matrix cell sheets: An experimental study in rats. Arch Oral Biol 2016; 72:138-45.
- Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells – Current trends and future prospective. Bioscience Reports 2015; 35:191.
- Vahabi S, Amirizadeh N, Shokrgozar MA, Mofeed R, Mashhadi AF, Aghaloo M, Sharifi D, Jabbareh L. A comparison between the efficacy of Bio-Oss, hydroxyapatite tricalcium phosphate and combination of mesenchymal stem cells in inducing bone regeneration. Chang Gung Med J 2012; 35:28-37.

- Valentim R; Andrade S; Dos Santos M; Santos A; Pereira V; Dos Santos I et al. Composite Based on Biphasic Calcium Phosphate (HA/_-TCP) and Nanocellulose from the Açai Tegument. *Materials* 2018; 11:2213-29.
- Vulcano E, Murena L, Falvo DA, Baj A, Toniolo A, Cherubino P. Bone marrow aspirate and bone allograft to treat acetabular bone defects in revision total hip arthroplasty: preliminary report. *Eur Rev Med Pharmacol* 2013; 17:2240-9.
- Wang L, Cheng L, Zhang B, Wang N, Wang F. Tanshinone prevents alveolar bone loss in ovariectomized osteoporosis rats by up-regulating phosphoglycerate dehydrogenase. *Toxicol Appl Pharm* 2019; 376:9-16.
- Wang L, Shi S, Bai R, Wang Y, Gou Z, Li D. Biological properties of bone marrow stem cells and adipose-derived stem cells derived from T2DM rats: a comparative study. *Cell Biosci* 2020; 10:102.
- Wang L, Zhang B, Bao C, Habibovic P, Hu J, Zhang X. Ectopic osteoid and bone formation by three calcium-phosphate ceramics in rats, rabbits and dogs. *PLOS ONE* 2014; 9: 107-44.
- Wang Y, Wang K, Li X, Wei Q, Chai W, Wang S, et al. 3D fabrication and characterization of phosphoric acid scaffold with a HA/ β -TCP weight ratio of 60:40 for bone tissue engineering applications. *PLOS ONE* 2017; 12:e0174870.
- Wei1 FY, Leung KS, Li G, Qin J, Chow SK, Huang S, et al. Low intensity pulsed ultrasound enhanced mesenchymal stem cell recruitment through stromal derived factor-1 signaling in fracture healing. *PLOS ONE* 2014; 9:106-72.
- Weira MD, Hockin HK. Human bone marrow stem cell-encapsulating calcium phosphate scaffolds for bone repair. *Acta Biomater* 2010; 6:4118-26.
- Wu W, Chen X, Mao T, Chen F, Feng X. Bone marrow-derived osteoblasts seeded into porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandibular. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2006; 12:268-76.

- Wu X; Zhang Y; Xing Y; Zhao B; Zhou C; Wen Y. High-fat and high-glucose microenvironment decreases Runx2 and TAZ expression and inhibits bone regeneration in the mouse. *J Orthop Surg Res* 2019; 14:55-64.
- Wubneh A; Tsekoura EK; Ayranci C; Uludag H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2018; 80:1-30.
- Xu MT, Sun S, Zhang S, Xu F, Du SL, Zhang XD et al. Diabetes mellitus affects the biomechanical function of the callus and the expression of TGF-beta1 and BMP2 in an early stage of fracture healing. *Braz J Med Biol Res* 2016; 49:4736.
- Yagyuu T, Kirita T, Hattori K, Tadokoro M, Oghushi H. Unique and reliable rat model for the assessment of cell therapy: bone union in the rat mandibular symphysis using bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2015; 9:276-85.
- Yang W, Both SK, Van Osch GJVM, Wang Y, Jansen JA, Yang F. Performance of different three-dimensional scaffolds for in vivo endochondral bone generation. *Eur Cell Mater* 2014; 27:350-64.
- Yu Z, Kun Z, Rui Z, Xingjiang Y, Xuening C, Zhanwen X, et al. Bone regeneration with micro/nano hybrid-structured biphasic calcium phosphate bioceramics at segmental bone defect and the induced immunoregulation of MSCs. *Biomaterials* 2017; 147:133-44.
- Zhang Q, King D, Zhang Y, Miron RJ. Histomorphometric Study of New Bone Formation Comparing Defect Healing with Three Bone Grafting Materials: The Effect of Osteoporosis on Graft Consolidation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2018; 33:645-52.
- Zimmermann EA, Schaible E, Gludovatz B, Schmidt FN, Riedel C, Krause M et al. Intrinsic mechanical behavior of femoral cortical bone in young, osteoporotic and bisphosphonate treated individuals in low- and high energy fracture conditions. *Sci Rep* 2016: 1-12.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13:4279-95.

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

VIII. ANEXO

8. ANEXO

UNIVERSIDAD DE
MURCIAVicerrectorado de
InvestigaciónCEEA Comité Ético de
Experimentación
Animal

CAMPUS MARE NOSIBUM

Código CEEA: 154/2015

INFORME DE COMITÉ ÉTICO

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

DATOS DEL CENTRO

Nombre: **CEEA Universidad de Murcia**Número de Registro del Centro: **REGA ES300305440012**

Título del procedimiento: *"Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de médula ósea y células madre adiposas de la bola adiposa de Bichat) en materiales bioacéricos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas y osteoporóticas"*

Responsable: D. Fabio Camacho Alonso
Fondos Propios

Aspectos que han sido considerados para su evaluación:

- Capacitación del personal investigador
- Idoneidad del procedimiento en relación a los objetivos del estudio.
- Metodología empleada
- Posibilidad de conseguir conclusiones válidas con el menor nº posible de animales
- Consideraciones de métodos alternativos
- Idoneidad de las especies seleccionadas
- Supervisión, Criterios de Punto Final y Finalización del Procedimiento

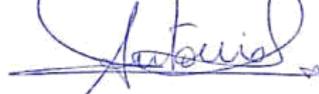
Una vez evaluado el procedimiento antes mencionado, atendiendo a los puntos indicados y de conformidad con lo acordado el día 14 de mayo de 2015¹, el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia, **INFORMA FAVORABLEMENTE** sobre la realización de dicho procedimiento.

Murcia, 15 de mayo de 2015

D^a. Carmen Lagares Martínez


Secretaria CEEA

D. Antonio Juan García Fernández



Presidente CEEA

¹ A los efectos de lo establecido en el art. 27.5 de la Ley 30/1992 de 26 de noviembre de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del P.A.C. (B.O.E. 27-11), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis

Uso de la terapia celular (células madre mesenquimales de la médula ósea y células madre mesenquimales de la bola adiposa de Bichat) en materiales biocerámicos para la regeneración ósea de la sínfisis mandibular de ratas sanas, diabéticas, osteoporóticas y diabéticas con osteoporosis