



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

REGENERACION OSEA POR IMPLANTE DE
CELULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS
DE TEJIDO ADIPOSEO HUMANO EN UN MODELO
ANIMAL

Itali Marcelly Linero Segrera

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA
BOGOTA COLOMBIA
2012

REGENERACION OSEA POR IMPLANTE DE
CELULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS
DE TEJIDO ADIPOSEO HUMANO EN UN MODELO
ANIMAL

*Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de
Doctor en Biotecnología*

Itali Marcelly Linero Segrera
Codigo: 837006

Orlando Chaparro Garzón , PhD.
Director de Tesis

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA
BOGOTA COLOMBIA
2012

Agradecimientos

A Dios, por ser mi guía en cada uno de los momentos de mi vida.

A mi familia por su apoyo, comprensión, incondicionalidad y compañía durante todo este tiempo.

A el Doctor Orlando Chaparro, mi director de tesis, le agradezco la oportunidad que me brindo al creer en mi, sus consejos y enseñanzas ayudaron en mi formación personal y académica. Por su tiempo, disposición, paciencia, colaboración y guía en el desarrollo de este trabajo.

A la Doctora Martha Raquel Fontanilla, por su gran colaboración, ayuda y disposición.

A los miembros del comité tutorial de mi trabajo de tesis, por sus aportes, correcciones, exigencia y diligencia durante mi proceso de formación.

Al Doctorado en Biotecnología por su colaboración y ayuda para llevar a cabo mis estudios y este trabajo doctoral.

Al Bioterio Central de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional, a su director el doctor Jesús Cortes por permitir el uso de sus instalaciones y especialmente a Angelita y Arturo por su gran apoyo, ayuda, diligencia y enseñanza en el manejo del modelo animal.

A la Clinica de Pequeños Animales de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional, especialmente a la Doctora Lucía Carvajal y al Doctor Jose Luis Granados por permitir el uso de sus instalaciones y por su ayuda profesional para la realización de las cirugías en los conejos.

A la Doctora Yineth del Departamento de Patología de la Universidad Nacional por su ayuda, colaboración y enseñanza durante la evaluación histológica realizada en este trabajo.

Al el equipo que conforma el laboratorio de Patología del Instituto Nacional de Salud especialmente a Marcela Neira, por apoyo incondicional y gran colaboración en el procesamiento histológico e inmunohistoquímico de los especímenes quirúrgicos, pero sobre todo gracias por su amistad.

A Adriana Doncell por la inmensa colaboración incondicional durante todo este proceso, por sus consejos, sus sugerencias, su dedicación y por su gran amistad.

A Juan Manuel Escobar, por su gran colaboración, disposición y ayuda incondicional.

A los demás compañeros del grupo Biología de Células Madre: Lyda, Orietta, Ximena, Diana y Rafael.

A Leidy Espinosa, por su ayuda, por sus consejos, sus sugerencias y por ser mi amiga.

A los compañeros del grupo de Ingeniería de Tejidos: Eduard, Dianita Millan, Diana Nieto, Sergio, Rosa Helena y Don Rafa.

A mis compañeros de trabajo de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional.

A mi equipo de trabajo de la familia INTERDENT.

Al laboratorio equipos comunes de la Facultad de Medicina, especialmente a Yolanda Cardenas por su ayuda y colaboración.

Y finalmente, agradezco a todos los que contribuyeron de alguna u otra forma en el desarrollo de este trabajo.

Índice de Contenidos

Índice de Contenidos	1
Índice de Figuras	9
Índice de Tablas.....	15
Resumen	17
Abstract	19
Introducción.....	21
Capítulo 1 Marco Teórico	23
1.1. Biología de la regeneración ósea.....	23
1.2. Tratamiento de las lesiones en el tejido óseo	27
1.2.1. Ingeniería del tejido óseo	29
1.2.2. Células Madre Mesenquimales	35
1.3. Aplicación de Células Madre Mesenquimales para la regeneración ósea..	39
Capítulo 2 Justificación y Objetivos	47
2.1. Justificación.....	47
2.2. Objetivos	49
2.2.1. Objetivo general	49
2.2.2. Objetivos Específicos.....	49
Capítulo 3 Diseño Metodológico	51
3.1. Fase in Vitro	51
3.1.1. Obtención y procesamiento de la muestra de tejido adiposo humano.....	51
3.1.2. Cultivo de las Células Madre Mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (Ad-MS) en monocapa.....	53
3.1.3. Caracterización Fenotípica de las Ad-MS	54
3.1.4. Diferenciación Osteogénica	56
3.1.5. Ensayo de proliferación de las Ad- MS en monocapa.....	57
3.1.6. Cultivo de las Célula Madre Mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (Ad-MS) en hidrogeles de plasma sanguíneo humano.....	58
3.1.7. Proliferación celular de las Ad-MS en hidrogeles de plasma sanguíneo humano.....	58
3.1.8. Diferenciación osteogénica de Ad-MS en hidrogeles de plasma sanguíneo humano	60
3.1.9. Obtención de medios condicionados.....	60

3.1.10. Elaboración de hidrogeles de plasma sanguíneo humano.....	61
3.1.11. Elaboración de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSA.....	61
3.1.12. Elaboración de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con medios condicionados.....	61
3.2. Fase in vivo	62
3.2.1. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSA en defectos óseos mandibulares de conejos	63
3.2.2. Permanencia de las Ad-MSA en hidrogeles de plasma sanguíneo humano implantadas en defectos óseos mandibulares de conejos.....	68
3.2.3. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano elaborados con Medios Condicionados en defectos óseos mandibulares de conejos	70
Capítulo 4 Resultados.....	73
4.1. Fase in vitro	73
4.1.1. Caracterización de la Ad-MSA en monocapa	73
4.1.2. Diferenciación osteogénica de Ad-MSA en monocapa.....	76
4.1.3. Ensayo de Proliferación celular en monocapa	77
4.1.4. Cultivo de las Ad-MSA en hidrogeles de plasma sanguíneo humano.....	78
4.1.5. Evaluación in vitro de la proliferación celular con el sistema Hoeshst.....	79
4.1.6. Evaluación in vitro de la proliferación celular con el sistema DAPI	80
4.1.7. Evaluación in vitro de la proliferación celular con el sistema Vybrant CFDA.....	80
4.1.8. Evaluación in vitro de la proliferación celular con MTT.....	81
4.1.9. Diferenciación osteogénica de Ad-MSA en hidrogeles de plasma sanguíneo humano	82
4.2. Fase in vivo	83
4.2.1. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSA en defectos óseos mandibulares de conejos	83
4.2.2. Permanencia de las Ad-MSA en hidrogeles de plasma sanguíneo humano implantadas en defectos óseos mandibulares de conejos.....	96
4.2.3. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano elaborados con Medios Condicionados en defectos óseos mandibulares de conejos	97
Capítulo 5 Discusión y Conclusiones.....	103
5.1. Discusión.....	103
5.2. Conclusiones	107
Bibliografía.....	108

Índice de Figuras

Figura 3.1. Diagrama de flujo del diseño metodológico de la fase in vitro. Aislamiento, cultivo y caracterización de las Ad-MSCs humanas	52
Figura 3.2. Diagrama de flujo del diseño metodológico de la fase in vitro. Cultivo de las Ad-MSCs en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. Elaboración de Hidrogeles con medios condicionados	53
Figura 3.3. Diagrama de flujo del diseño metodológico de la fase in vivo. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano elaborados con Ad-MSCs y con medios condicionados	62
Figura 3.4. Diseño Experimental. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC en defectos óseos mandibulares de conejos. Distribución de unidades experimentales y asignación de tratamientos a cada unidad experimental.....	63
Figura 3.5. Procedimiento quirúrgico. A. Preparación de campo operatorio con la exposición de los rebordes mandibulares bilaterales. B. incisión en piel. C. Exposición de ángulo mandibular. D. Realización de defecto óseo con Trefina. E. Demarcación de defecto óseo circular. F. Defecto óseo mandibular. G. Implantación de Hidrogel de plasma sanguíneo humano. H. Hidrogel de plasma sanguíneo ya posicionado en el sitio de la lesión.	65
Figura 3.6. Diseño experimental. Evaluación de la permanencia de las Ad-MSC en hidrogeles de plasma sanguíneo humano implantadas en defectos óseos mandibulares de conejos. Distribución de unidades experimentales y asignación de tratamientos a cada unidad experimental.....	68
Figura 3.7. Diseño Experimental. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con medios condicionados en defectos óseos mandibulares de conejos. Distribución de unidades experimentales y asignación de tratamientos a cada unidad experimental.....	70
Figura 4.1. Obtención y cultivo de Ad-MSC a partir de tejido adiposo humano. A. Semanal, se observan células fibroblastoides adyacentes al explante de tejido adiposo (flecha blanca). B. Semana 2 - 3, Presencia de células fibroblastoides, adherentes al plástico con morfología homogénea. Magnificación 10X.....	74
Figura 4.2. Caracterización de las Ad-MSC por RT-PCR. La expresión de marcadores de superficie característicos de MSCs humanas se determinó en las células aisladas de tejido adiposo de cuarto pasaje por RT-PCR. Líneas 1- 6, corresponde a Ad-MSCs. Línea PM: patrón de peso de molecular de 100pb. Línea 1: CD 105. Línea 2:	

CD73. Línea 3: CD166. Línea 4 : CD44. Línea 5: CD34. Línea 6: GAPDH CN: Control negativo..... 74

Figura 4.3 Caracterización de las células Ad-MSc por citometría de flujo. Las células mesenquimales obtenidas a partir de tejido adiposo de sexto pasaje y en 70% de confluencia, se marcaron con anticuerpos monoclonales. En color verde podemos observar las Ad-MSc. A. Células marcadas con CD90 Alexa, B. Célula marcadas con CD105 PE, Células marcadas con HLA I FITC, D. Células marcadas con CD45 RPECy5, E. Células marcadas con CD34 FITC, F. Células marcadas con HLA II RPE.

..... 75

Figura 4.4 Diferenciación Osteogénica de las Ad-MSc. Las células fueron cultivadas en medio de diferenciación osteogénica y en medio convencional por tres semanas. 77

Figura 4.5 Análisis de proliferación celular de las Ad-MSc en Monocapa: Las Ad-MSc fueron cultivadas en una concentración de 9500 células por pozo. Posteriormente se detectó la presencia de formazán con el ensayo Vybrant® MTT Cell proliferation assay kit (Invitrogen™ V-13154). Se realizaron lecturas entre los días 1 y 12 de cultivo..... 78

Figura 4.6 Cultivo de las Ad-MSc en hidrogeles de plasma sanguíneo humano: A. El hidrogel de plasma sanguíneo humano exhibe una composición homogénea, sin sedimentos ni turbidez, transparente y de fácil manipulación. B. Microscopía electrónica de barrido: Sección representativa del hidrogel de plasma sanguíneo humano donde se observan las redes de fibrina formando una estructura tridimensional con poros interconectados entre sí. Magnificación 25000X C. Día 2 de cultivo de las Ad-MSc en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. D. Día 7 de cultivo de las Ad-MSc en hidrogeles de plasma sanguíneo humano, Magnificación 10X. 79

Figura 4.7 Proliferación de las Ad-MSc en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. Las células fueron cultivadas en hidrogeles de plasma sanguíneo humano previo marcaje con el sistema Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit. La proliferación de las células sembradas fue medida desde el día 0 hasta el día 18 de cultivo. A: Día 1, B: Día 3, C: Día 6, D: Día: 9. 80

Figura 4.8 Curva patrón de proliferación celular con MTT: Se colocó la solución de MTT en pozos con un número determinado de células. Se graficó la media de los valores de absorbancia medida en cada muestra a 570nm. 81

Figura 4.9 Curva de Proliferación celular: Evaluación de proliferación de Ad-MSCs sembradas en los hidrogeles de plasma sanguíneo humano por el método del MTT. La proliferación de las células sembradas fue medida desde el día 0 hasta el día 14 de cultivo relacionando la viabilidad celular con la actividad metabólica de las células frente al MTT (Media \pm DS)..... 82

Figura 4.10 Diferenciación Osteogénica de las Ad-MSc en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. Las células fueron cultivadas en medio de diferenciación osteogénica y en medio convencional por tres semanas. 83

Figura 4.11. Seguimiento Radiográfico de defectos óseos: Imágenes radiográficas de defectos óseos tratados con hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSc y defectos tratados con el hidrogel sin células (control) a los días 0, 15, 45 y 60. El círculo amarillo corresponde a el tamaño del defecto óseo inicial 85

Figura 4.12 Comparación de imágenes radiográficas de defectos óseos con diferentes tratamientos. A. Tamaño inicial de la herida quirúrgica B. Cicatrización por segunda intención a los 45 días. C. Defecto óseo tratado con hidrogel sin células a los 45 días. D. Defecto óseo tratado con hidrogel con Ad-MSC a los 45 días. El círculo amarillo representa el tamaño inicial del defecto óseo. 86

Figura 4.13 Evaluación radiográfica de la neoformación de tejido óseo. Evaluación radiográfica del porcentaje de tejido óseo neoformado a los 15, 30, 45 y 60 días después de haber injertado hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC (azul oscuro) e hidrogeles de plasma sanguíneo humano sin células Ad-MSC (azul claro). 87

Figura 4.14 Evaluación radiográfica de la densidad ósea. Evaluación radiográfica la densidad ósea del tejido neoformado a los 15, 30, 45 y 60 días después de haber injertado hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC (azul oscuro) e hidrogeles de plasma sanguíneo humano sin células Ad-MSC (azul claro). 88

Figura 4.15 Especímenes quirúrgicos de la zona del defecto óseo. Imágenes representativas de los especímenes quirúrgicos a los 15, 30 y 45 días posoperatorios. 89

Figura 4.16 Análisis Morfométrico de neoformación de tejido óseo. A. Especimen quirúrgico donde se evidencia el defecto óseo 45 días después de la implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano en sin Ad-MSC B. Especimen quirúrgico donde se observa defecto óseo 45 días después de la implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC. C y D Diagramación esquemática de la regeneración ósea de los especímenes quirúrgicos observados en los paneles A y B respectivamente, la línea punteada blanca representa el tamaño inicial del defecto óseo, la línea continua amarilla representa el tamaño final del defecto óseo y las líneas rojas representan el área de hueso neoformado. 90

Figura 4.17 Evaluación de la formación de tejido óseo. Se midió porcentaje de regeneración de hueso Morfométricamente. Se graficó la Media \pm DS del porcentaje de hueso reconstruido a los 15, 30,45 y 60 días, con o sin aplicación de Ad-MSC. 91

Figura 4.18 Comparación histológica de los defectos óseos de injertados con hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC y sin Ad-MSC a los 15, 45 y 60 días. Tinción con hematoxilina eosina. Magnificación 40X. A y B. Se observa tejido fibroconectivo con respuesta inflamatoria crónica moderada y tejido óseo inmaduro con osteoblastos en su interior (flecha). C. Se observa tejido óseo inmaduro dispuesto de forma desordenada. D. Se observan líneas de aposición ósea de manera organizada (flechas) en el tejido óseo inmaduro. E, Tejido óseo inmaduro con osteocitos en su interior (flecha), F. Tejido óseo maduro con empalizada osteoblástica en la parte superior (flechas). Convenciones: Tejido óseo (TO), Tejido Fibroconectivo (TFC). 92

Figura 4.19 Comparación histológica de los defectos óseos de injertados con hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC y sin Ad-MSC a los 15, 45 y 60 días. Tinción con Azul de Toloudina. Magnificación 40X. En todos los paneles se evidencia que el principal tipo de osificación que se da en el proceso de regeneración ósea en todos los individuos es intramembranosa. 93

Figura 4.20 Comparación histológica de los defectos óseos de injertados con hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC y sin Ad-MSC a los 15, 45 y 60 días. Tinción con Azul de Toloudina. Magnificación 10X.A. Tejido fibroconectivo

generalizado en color magenta con pequeñas fibras de colágeno entremezcladas (azul claro) B. Gran cantidad de tejido fibroconectivo con pequeños núcleos de formación ósea (flecha). C Tejido fibroconectivo generalizado, D. En azul claro se observa el hueso neoformado con pocos focos de mineralización que se evidencian como pequeñas zonas rojizas (flecha). E. Tejido óseo neoformado con pequeños focos de osificación (flecha). F. Tejido óseo inmaduro en azul claro y grandes zonas de calcificación en color rojizo (flecha)..... 94

Figura 4.21 Regeneración ósea en el defecto óseo que cicatrizó por segunda intención. A. Tinción con Hematoxilina-Eosina, se observa tejido óseo inmaduro con osteoblastos embebidos en el. B, Tinción con Azul de Toloudina, se evidencia que la osificación es principalmente de tipo intramembranosa. C, Tinción con Tricrómico de Masson, en azul el hueso neoformado y en rojo focos de calcificación (flecha). Magnificación 40X. 95

Figura 4.22 Detección por inmunohistoquímica de la $\beta 2$ microglobulina humana en la zona de regeneración tisular. A. Control positivo de la reacción, piel humana. B. Control positivo hueso humano. C. Control negativo, hueso de conejo. D. Zona de regeneración tisular a los 3 días de la implantación del hidrogel de plasma sanguíneo con Ad-MS, inmunotinción positiva para la β -2 microglobulina humana (flechas). E. Zona de regeneración tisular a los 6 días de la implantación del hidrogel de plasma sanguíneo con Ad-MS, inmunotinción positiva para la β -2 microglobulina humana (flechas). F. Zona de regeneración tisular a los 12 días de la implantación del hidrogel de plasma sanguíneo con Ad-MS. Magnificación 10X. 96

Figura 4.23 Comparación de imágenes radiográficas de defectos óseos con diferentes tratamientos con medios condicionados. A. Tamaño inicial de la herida quirúrgica B. Cicatrización por segunda intención a los 45 días. C. Defecto óseo tratado con hidrogel elaborado con medios condicionados a una concentración 100 μ g/ml a los 45 días. D. Defecto óseo tratado con hidrogel elaborado con medios condicionados a una concentración 200 μ g/ml a los 45 días. El círculo amarillo representa el tamaño inicial del defecto óseo. 98

Figura 4.24 Evaluación radiográfica de la neoformación de tejido óseo. Evaluación radiográfica del porcentaje de tejido óseo neoformado a los 45 días después de haber implantado hidrogeles de plasma sanguíneo humano elaborados con MC en una concentración de 100 μ g/ml y 200 μ g/ml. 99

Figura 4.25 Especímenes quirúrgicos de la zona del defecto óseo. Imágenes representativas de los especímenes quirúrgicos 45 días después de haber implantado los hidrogeles de plasma sanguíneo con MC en una concentración de 100 μ g/ml y 200 μ g/ml. 100

Figura 4.26 Evaluación de la formación de tejido óseo. Se midió porcentaje de regeneración de hueso Morfométricamente. Se graficó la Media \pm DS del porcentaje de hueso reconstruido con los dos tratamientos: hidrogel con MC a una concentración 100 μ g/ml y 200 μ g/ml. 101

Figura 4.27 Comparación histológica de los defectos óseos de injertados con hidrogeles de plasma sanguíneo humano con medios condicionados en concentración 100 μ g/ml y 200 μ g/ml. A y B Tinción con hematoxilina eosina, se observan gran cantidad de osteocitos (flecha) embebidos en su matriz ósea neoformada C y D Tinción

con Azul de Toloudina, se evidencia que el tipo principal de osificación es endocondral
E y F Tinción con Tricrómico de Masson.E, Matriz ósea con osteocitos (flecha) en su
interior. F, Matriz ósea con focos de calcificación en rojizo (flechas). Magnificación
40X..... 102

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Utilización de hidrogeles de fibrina para medicina regenerativa ósea y cartilaginosa.....	33
Tabla 1.2. Ensayos in vitro del potencial osteogénico de las células madre mesenquimales.....	40
Tabla 1.3. Estudios realizados en modelo animal de la aplicación de células madre mesenquimales para la regeneración del tejido óseo	41
Tabla 1.4. Estudios clínicos realizados en humanos aplicando células madre mesenquimales en regeneración de tejido óseo	45
Tabla 3.1. Lista de primers utilizados para la caracterización de las Ad-MSC por RT-PCR.....	55
Tabla 3.2. Soluciones para la coloración de fosfatasa alcalina.....	57
Tabla 3.3 Escala ordinal para la evaluación de la densidad ósea relativa	67
Tabla 4.1 Estadísticos descriptivos del porcentaje de reconstrucción de hueso medido morfométricamente	90

Resumen

La reconstrucción y restauración de la función esquelética continúa siendo un reto en el campo de la cirugía maxilofacial y la ortopedia. Una alternativa o terapia coadyudante a los tratamientos convencionales es la ingeniería de tejidos que surge como una posibilidad prometedora para la regeneración del tejido óseo. Con el fin de crear un modelo para la aplicación clínica de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (Ad-MSCs) desarrollamos una matriz tridimensional de plasma sanguíneo humano que proporciona un soporte adecuado para que las células puedan mantenerse, proliferar y diferenciarse funcionalmente hacia el linaje osteogénico. En este trabajo se demostró que la terapia con Ad-MSCs en un modelo animal mejora el proceso de regeneración ósea. Esto se puede atribuir principalmente a la liberación de factores paracrinos que median mecanismos de supervivencia y proliferación celular, neovascularización, remodelación y regeneración tisular. Los resultados apoyan la posibilidad de desarrollar una estrategia terapéutica utilizando los medios condicionados y no necesariamente las células madre mesenquimales (MSCs).

Palabras clave:

Células Madre Mesenquimales, Medios Condicionados, Regeneración Tisular, Regeneración Osea, Diferenciación osteogénica, Hidrogeles de plasma sanguíneo.

Abstract

The reconstruction and restoration of skeletal function remains a challenge in the field of maxillofacial surgery and orthopedics. As an alternative or adjunct therapy to conventional treatments, tissue engineering emerges as a promising possibility for regeneration of bone tissue. To create a model for the clinical application of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue (Ad-MSCs) we developed a three dimensional scaffold of human blood plasma that provides adequate support where the cells can be maintained, proliferate and differentiate functionally to the osteogenic lineage. In this paper, we showed that Ad-MSCs therapy in an animal model improves bone regeneration process, which can be explained mainly to the release of paracrine factors that mediate mechanisms of survival and proliferation cell, neovascularization, remodeling and tissue regeneration. The results support the possibility of developing a therapeutic strategy using conditioned media and not necessarily mesenchymal stem cells (MSCs).

Keywords:

Mesenchymal stem cells, conditioned medium, tissue regeneration, Bone regeneration, Hydrogels of blood plasma

Introducción

Los defectos óseos se presentan como secuelas producto de trauma, tumores, infecciones, desordenes bioquímicos o desarrollo esquelético anormal. Todas estas situaciones clínicas son importantes causas de incapacidad funcional y estética en el campo de la cirugía maxilofacial y la ortopedia, y su restauración continúa siendo un reto importante en el área médica.

Uno de los objetivos del tratamiento de un defecto óseo es restaurar la forma y función ideal de la estructura afectada. Para lograrlo, se han desarrollado técnicas quirúrgicas específicas como la distracción osteogénica, la implantación de biomateriales (sustitutos óseos) y el implante de injertos óseos, de los cuales los más usados son: hueso autólogo (del mismo paciente), hueso heterólogo (de un donante) matrices desmineralizadas y una amplia gama de biomateriales sintéticos como metales, cerámicas, polímeros, materiales compuestos, entre otros. (Lane, Tomin, & Bostrom, 1999; Meinel et al., 2006).

A pesar de los avances en la regeneración ósea y la disponibilidad de gran cantidad de modalidades de tratamiento, la mayoría de los clínicos e investigadores continúan llegando a la misma conclusión: los injertos óseos autólogos siguen siendo el estándar de oro al compararlos con otros procedimientos reconstructivos. El hueso proveniente del mismo paciente carece de inmunogenicidad y posee células osteoprogenitoras que llegan directamente al sitio del implante. Sin embargo, los injertos óseos autólogos tienen varias limitaciones importantes, como disponibilidad de sitios competentes y morbilidad de la zona donadora (Cancedda, Giannoni, & Mastrogiacomo, 2007).

Para reducir esta problemática, la ingeniería de tejidos está surgiendo como la mejor estrategia para reparar, reconstruir o regenerar tejidos utilizando células y biomoléculas en una matriz tridimensional.

La evidencia científica demuestra que el uso de células madre mesenquimales es la mejor opción en terapia celular, por su facilidad de acceso y aislamiento, gran potencial de expansión en cultivo, propiedades inmunosupresoras, efecto paracrino y capacidad de migrar hacia los tejidos lesionados (Salem & Thiemermann, 2010).

El combinar apropiadamente los elementos fundamentales de la ingeniería tisular, en un ambiente físico-químico adecuado, permite optimizar el proceso de reparación y regeneración ósea. Por esto, en esta propuesta, se evalúa el potencial osteogénico de las células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo embebidas en un hidrogel de plasma sanguíneo humano, durante el proceso de reparación ósea de lesiones mandibulares en un modelo animal.

Capítulo 1

Marco Teórico

Este capítulo plantea el estado del arte de la biología de la regeneración ósea y las estrategias terapéuticas instauradas desde la ingeniería de tejidos, enfocándonos en la aplicación de las células madre mesenquimales en la medicina regenerativa.

La primera sección, presenta los procesos biológicos involucrados en la regeneración ósea. En la segunda, se analizan los principios terapéuticos desde la ingeniería tisular para finalmente en la tercera sección exponer el concepto y las propiedades biológicas de las células madre mesenquimales, su aplicación en la medicina regenerativa y la importancia que ellas tienen en la reparación y regeneración específica del tejido óseo.

1.1. Biología de la regeneración ósea

Es un consenso en el entendimiento contemporáneo, que la cicatrización ósea implica la interacción coordinada de un gran número de factores a nivel molecular y celular que se encuentran directamente relacionados con los principios fisiológicos y bio-mecánicos de la biología ósea. Durante la curación de heridas óseas cualquier déficit expresado en algún punto del ciclo de cicatrización, altera la secuencia fisiológica y predispone a complicaciones. Por esto la comunidad científica se ha centrado en la comprensión de los aspectos moleculares, fisiopatológicos y biomecánicos de la reparación ósea.

La cicatrización ósea es un complejo, pero bien orquestado, proceso regenerativo donde se repiten los mecanismos moleculares que regulan la formación tisular esquelética durante el desarrollo embrionario. Muchos factores sistémicos y locales incluyendo factores de crecimiento, factores de diferenciación, hormonas, citoquinas y la matriz extracelular, interactúan con varios tipos celulares, entre ellos, las células progenitoras de hueso y de cartílago.

El esqueleto axial y apendicular proviene de distintas partes del mesodermo, de los somitas y de la placa mesodérmica lateral, mientras que el esqueleto craneal y facial proviene de la cresta neural. En ambos casos el tejido óseo y cartilaginoso tiene su origen en las células madre mesenquimales que se precipitan en un proceso de diferenciación

que implica la expresión de genes propios para cada caso. La mayor parte del hueso mesodérmico se origina por osificación endocondral, que supone la formación de cartílago previo al tejido óseo, es decir, las condensaciones mesenquimáticas dan lugar a un patrón de cartílago hialino que posteriormente es destruido y sustituido por hueso, este tejido óseo es formado por nuevas células madre mesenquimales que se diferencian en osteoblastos e invaden el espacio dejado por las células cartilaginosas (condrocitos). Por el contrario, los huesos del esqueleto craneofacial se forman por osificación intramembranosa en la que las condensaciones mesenquimáticas se diferencian directamente en tejido óseo sin mediación de cartílago.

Los mecanismos moleculares que rigen la condrogénesis y la osteogénesis del esqueleto procedente de la cresta neural son algo diferentes a los que operan en la esqueletogénesis del resto del cuerpo, lo que no significa que las estrategias reparativas de ambos esqueletos deban regirse por parámetros diferentes.

En general, la reparación de los tejidos consiste en la formación de un tejido cicatrizal que sirve para unir los bordes del tejido dañado o para rellenar lo perdido. La cicatriz queda como un tejido diferente poco o nada integrado a la estructura y función del órgano. Comparativamente, la regeneración es un proceso lento que recapitula parte de los acontecimientos que ocurrieron en el desarrollo embrionario y que reestablece la estructura y función perdida, sin que deje señal morfológica alguna, ni déficit funcional. La cicatrización de las fracturas y/o heridas óseas reiteran ciertos aspectos del crecimiento y desarrollo del esqueleto, implicando una compleja interacción entre las células, los factores de crecimiento y la matriz extracelular.

Histológicamente, el proceso de cicatrización como tal se ha dividido en cicatrización directa (primaria) y cicatrización indirecta (secundaria).

Cicatrización Directa – Primaria: Este tipo de cicatrización ocurre cuando hay una fijación anatómicamente reducida de los fragmentos óseos, disminuyendo la tensión interfragmentaria. Durante este proceso las células mesenquimales perivasculares producen células osteoprogenitoras que se diferencian en osteoblastos; estas células producen una matriz inorgánica que posteriormente se mineraliza. Este proceso se denomina osificación intramembranosa, donde se forma el hueso directamente sin una primera formación de cartílago.

Cicatrización Indirecta – Secundaria: Este tipo de cicatrización implica la formación de tejido óseo logrando una combinación entre una osificación intramembranosa y endocondral. La osificación endocondral implica el reclutamiento, la proliferación y la diferenciación de células indiferenciadas mesenquimales en cartílago, que se calcifica y finalmente se sustituye por hueso (Tsiridis, Upadhyay, & Giannoudis, 2007).

La reparación ósea se ha dividido en cuatro etapas, cada una de ellas caracterizada por una serie de eventos celulares y moleculares que no tienen una clara delimitación sino que se solapan entre si. El modelo de cuatro etapas se originó como resultado de las observaciones histológicas tanto en modelos animales como en modelos humanos.

Etapa I – Inflamación: Una fractura ósea se asocia con la pérdida local de la integridad del tejido, la interrupción de la función vascular normal y la distorsión de la arquitectura ósea. Este daño provoca la extravasación sanguínea dentro del sitio de la fractura que gracias a la degranulación plaquetaria y a la secreción de citoquinas y factores de crecimiento por macrófagos y otras células inflamatorias como granulocitos, linfocitos y monocitos que permiten la formación de un coágulo de fibrina en el cual se reorganiza el tejido de granulación.

Esta respuesta celular esta coordinada por la secreción de una serie de citoquinas y factores de crecimiento, como por ejemplo: el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos - 2 (FGF-2), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Keramaris, Calori, Nikolaou, Schemitsch, & Giannoudis, 2008), el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), Interleuquinas 1 y 6 (IL-1, IL-6), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y el factor de necrosis tumoral (TNF), que facilitan el reclutamiento de las células inflamatorias y la migración e invasión de las células madre mesenquimales procedentes del periostio, la médula ósea, el torrente circulatorio y los tejidos blandos circundantes (Hsiong & Mooney, 2006; Tsiridis et al., 2007).

Etapa II – Formación de fibrocartilago o callo blando: Durante la segunda etapa, las fracturas que poseen algún tipo de inestabilidad mecánica cicatrizan por un proceso de osificación endocondral, en la cual la formación del hueso esta precedida por la creación de una plantilla fibro-cartilaginosa que proporciona un soporte mecánico para la formación ósea posterior.

Este estado esta dominado por condrocitos y fibroblastos. Los condrocitos derivados de las células progenitoras mesenquimales proliferan y sintetizan matriz cartilaginosa hasta que finalmente todo el tejido fibro-granular se sustituye por cartilago. En los estadios finales de la producción del callo blando, los condrocitos se hipertrofian y la matriz cartilaginosa se mineraliza antes de que ellos entren en apoptosis.

La diferenciación y proliferación de condrocitos y fibroblastos es estimulada por la expresión coordinada de factores de crecimiento como el TGF- β 2 y β 3, el PDGF, el factor de crecimiento de fibroblastos - 1 (FGF-1) y el factor de crecimiento similar a la Insulina (IGF). Adicionalmente, los miembros de la familia de las BMPs (BMP 2, 4, 5 y 6) promueven la proliferación y la condrogénesis. En respuesta a estos factores, los condrocitos son capaces de generar cantidades considerables de proteínas de la matriz extracelular, particularmente colágeno tipo II (o colágeno tipo X por los condrocitos hipertróficos).

El callo cartilaginoso es principalmente avascular pero a medida que se va reemplazando por tejido óseo va aumentando la invasión por las células endoteliales vasculares, vasos sanguíneos y capilares en crecimiento como respuesta al estímulo generado por factores proangiogénicos como VEGF, BMPs, FGF-1 y TGF- β . La expresión de VEGF por las células osteogénicas es dependiente de los factores reguladores del cartilago y hueso Cbfa1/Runx2, que se encuentran altamente expresados en las etapas tempranas de la respuesta inflamatoria y mesenquimal, al igual que la Angiopoyetina I y II que regulan la morfogénesis de los grandes vasos y ayudan al desarrollo de los vasos colaterales a partir de los vasos ya existentes.

Etapa III – Formación Primaria de Hueso o callo duro: La etapa de formación de callo duro también conocida como formación primaria de hueso, representa el periodo más activo de la osteogénesis. Esta caracterizado por altos niveles de actividad osteoblástica y formación de matriz ósea mineralizada. Durante condiciones de estabilidad mecánica o crecimiento óseo aposicional, el hueso se forma adyacente a la superficie mineralizada ya existente en ausencia de una plantilla cartilaginosa, es decir, de manera intramembranosa; sin embargo, en la mayoría de los casos se da cierto nivel de osificación endocondral. La matriz de tejido óseo es sintetizada por los osteoblastos maduros los cuales se diferenciaron a partir de células osteoprogenitoras en presencia de factores osteogénicos.

Los factores de diferenciación Sox9, junto con Sox5 y Sox6, regulan la diferenciación de los condrocitos, mientras que Runx2 y Osterix controlan la diferenciación hacia el linaje osteoblástico (Zelzer & Olsen, 2003).

Los miembros de la superfamilia de las BMPs son mediadores importantes de este proceso. La vascularización es vital para la formación del callo duro y el aumento de la tensión local de oxígeno es necesario para la diferenciación osteoblástica.

Etapa IV – Remodelado Óseo o Formación de hueso secundario: Durante la etapa final de la reparación, el remodelado del callo óseo duro logra la configuración cortical y/o trabecular original, convirtiéndose el tejido óseo irregular en hueso lamelar. El proceso de neovascularización se mantiene durante esta etapa. La célula clave involucrada en la reabsorción del hueso ya mineralizado es el osteoclasto. Durante el remodelado, el osteoclasto se polariza y se adhiere a la superficie mineralizada formando en la interfase entre el hueso y el osteoclasto un microambiente donde se liberan ácidos y proteinasas dentro del dominio de resorción o zona clara. El medio ácido desmineraliza la matriz, mientras que las proteinasas degradan los componentes orgánicos, tales como el colágeno. Los productos de degradación son removidos por la vía vesicular a partir del borde rugoso del dominio funcional secretor de los osteoclastos que posteriormente pueden entrar en apoptosis o retornar a la forma no reabsortiva. La reabsorción ósea por parte de los osteoclastos crea unos pozos erosivos sobre la superficie del hueso conocidos como lagunas de Howship. Una vez completada la reabsorción, el osteoblasto es capaz de dejar una nueva capa de hueso sobre la superficie erosionada (Schindeler, McDonald, Bokko, & Little, 2008).

Aunque durante muchos años se pensaba que entre los osteoblastos y los osteoclastos existía un proceso coordinado de formación y reabsorción, no fue hasta 1997 cuando las bases moleculares de este paradigma fueron descubiertas en la forma de la osteoprotegerina (OPG) y poco tiempo después su ligando OPG-L. La OPG es miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), que a diferencia de todos sus parientes, no permanece tras su síntesis como una proteína transmembranal sino que es secretada como proteína soluble por los osteoblastos (Ferrer Cañabate J, 2002). Actúa como socio competitivo soluble neutralizando al ligando de unión al receptor activador NF- κ B (RANKL), antagoniza la diferenciación osteoclástica inhibiendo la osteoclastogénesis y por consiguiente la reabsorción ósea (Sommerfeldt & Rubin, 2001).

Las dos principales citoquinas secretadas por los osteoblastos que son críticas en la inducción y supervivencia de los osteoclastos son el factor estimulante de colonias macrófagos (M-CSF) y el RANKL. El M-CSF es importante en la inducción primaria de la

diferenciación hacia el linaje osteoclástico de las células madre hematopoyéticas y RANKL es un factor producido por los osteoblastos maduros que es responsable de la coordinación entre formación y reabsorción ósea (Schindeler et al., 2008). Estos dos factores son suficientes y necesarios para completar todo el ciclo de la maduración de los osteoclastos a partir de precursores inmaduros (Boyle, Simonet, & Lacey, 2003; Ferrer Cañabate J, 2002).

El receptor activador de NF- κ B (RANK), se expresa en osteoclastos maduros y en sus progenitores aislados de médula ósea. Su activación conlleva no solo a una reorganización en el citoesqueleto del osteoclasto y cambios fundamentales para su activación, supervivencia, movilidad y establecimiento en la superficie ósea a reabsorber, sino que desencadena una señal de supervivencia en el osteoclasto maduro.

Todos estos factores evidencian claramente que nos encontramos ante un sistema regulador importante del metabolismo óseo, con un equilibrio muy estrecho entre los procesos de formación y de resorción. La interacción entre la OPG-L liberada por los osteoblastos y/o células del estroma y su receptor RANK expresado en los precursores osteoclásticos y para la cual la OPG actúa como receptor señuelo secuestrando a OPG-L y evitando la activación de RANK, es fundamental para el correcto desarrollo de la osteoclastogénesis, no solo para la diferenciación de los precursores hematopoyéticos hasta osteoclastos inmaduros, sino también para la fusión de los osteoclastos mononucleares comprometidos entre sí para formar osteoclastos multinucleados, así como para activar osteoclastos maduros (Alliston & Derynck, 2002; Boyle et al., 2003; Ferrer Cañabate J, 2002).

1.2. Tratamiento de las lesiones en el tejido óseo

Tradicionalmente, las alteraciones del tejido óseo en el complejo maxilofacial son tratadas con trasplantes de injertos óseos (autólogos o heterólogos), sustitutos óseos o métodos de transporte óseo (Distracción osteogénica), que no proveen un resultado totalmente satisfactorio.

El uso de trasplantes óseos autólogos ha sido habitualmente la primera elección para la reparación y la regeneración ósea (Reynolds, Aichelmann-Reidy, Branch-Mays, & Gunsolley, 2003; Salgado, Coutinho, & Reis, 2004). El hueso proveniente del mismo paciente carece de inmunogenicidad y contiene células osteoprogenitoras que se suministran directamente en el sitio del implante. Además, los trasplantes óseos autólogos atraen células mesenquimales e inducen su diferenciación a células osteoprogenitoras mediante la producción de factores de crecimiento osteoinductores (Shanti, Li, Nesti, Wang, & Tuan, 2007). Las principales características que lo convierten en el tratamiento ideal son sus propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas.

Propiedades Osteoconductoras, porque proveen una matriz en la cual las células óseas pueden proliferar. Osteoinductivas, ya que inducen la proliferación de células indiferenciadas y su diferenciación a osteoblastos (es decir, el cambio de fenotipo de un estado primitivo a otro tipo de células que cumplan funciones especializadas); además, proveen

factores osteoconductivos esenciales para la regeneración ósea. Osteogénicas, dado que son un depósito de células que tienen la capacidad de formar nuevo hueso (Seiler & Johnson, 2000).

Aunque los autoinjertos presentan buenos porcentajes de éxito y evitan problemas inmunológicos, en muchos casos no es posible su uso debido a la cantidad limitada de tejido que puede ser tomada y a la morbilidad en el sitio de extracción (Bartold, McCulloch, Narayanan, & Pitaru, 2000; Donzelli et al., 2007).

Dentro de los homotrasplantes se encuentran los aloinjertos que implican la toma y procesamiento del hueso de un cadáver y luego su trasplante al paciente. Este tipo de injerto es acelular y presenta resultados menos positivos que los autoinjertos, ya que su porcentaje de oseointegración es menor, debido a la ausencia de células osteoprogenitoras, puede causar reacción inmune y transmitir patógenos del donante al hospedero (Alam et al., 2007; McKay, Peckham, & Badura, 2007).

Como una alternativa, están los xenoinjertos que representan una pequeña proporción de las terapias para reemplazo óseo y consisten en la utilización de fragmentos de hueso obtenidos de animales de diferente especie. El uso de estos trasplantes elimina la morbilidad del procedimiento para obtención del material de trasplante y la cantidad de material ya no es una limitante. Sin embargo, su calidad es aún menor que la de los trasplantes autólogos y presentan por lo general un bajo grado de celularidad, baja revascularización y un alto porcentaje de reabsorción lo cual conduce a una pobre neoformación ósea, además de la posibilidad de transmisión de enfermedades y rechazo inmunológico.

Existen implantes de materiales que no tienen su origen en seres vivos, como metales, plásticos y cerámicos. Éstos presentan varias desventajas, ya que están sujetos a la fatiga, fractura, toxicidad y desgaste, no se remodelan con el tiempo y pueden tener problemas de integración con los tejidos adyacentes.

En búsqueda de soluciones para los inconvenientes que presentan los injertos óseos se ha planteado a la Ingeniería del Tejidos como una alternativa prometedora para la reconstrucción de defectos óseos en cualquier parte del cuerpo. La creación del material de trasplante óseo ideal, debe incluir factores capaces de inducir la osteogénesis: factores de crecimiento osteoinductores (Tecnología basada en factores de crecimiento) y/o células progenitoras (Tecnología basada en células). En ambos casos se requiere el uso de un soporte tridimensional que actúe como un transportador. En la primera aproximación, tecnología basada en factores de crecimiento, se han utilizado factores como las BMPs que aunque se ha confirmado su potencial osteoinductor, presentan algunas limitantes como las altas concentraciones suprafisiológicas requeridas, posibles efectos colaterales y alto costo (Lind, 1996, 1998). Además, cuando se utiliza esta estrategia, generalmente se presenta una alta liberación inicial del factor de crecimiento seguida de una marcada reducción en la liberación a lo largo del tiempo, lo cual limita la efectividad del tratamiento a largo plazo. La segunda aproximación, tecnología basada en células, que ha creado grandes expectativas, combina la utilización de células con capacidad osteogénica y biomateriales que sirven como soporte y que permiten el desarrollo de una estructura tridimensional.

1.2.1. Ingeniería del tejido óseo

Como ya fue definido por Langer y Vacanti, la Ingeniería de Tejidos es un campo de investigación interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan y mejoren la función de un tejido (Langer & Vacanti, 1993). En contraste con el enfoque clásico de los biomateriales, la ingeniería tisular se basa en la comprensión de la regeneración tisular, induciendo la formación de nuevos tejidos funcionales y no la implantación de nuevas piezas de repuesto. Para lograr esto desde una perspectiva biológica se necesita de células, matriz extracelular, interacciones células - matriz y factores de crecimiento (Salgado et al., 2004).

Para optimizar la regeneración ósea y la restauración de las condiciones esqueléticas se han desarrollado varias estrategias y extensas investigaciones que han revelado los elementos importantes y necesarios para obtener resultados apropiados en la cicatrización ósea. La interacción de los cuatro factores clave que han sido conceptualizados como el “Concepto Diamante” son: células con potencial osteogénico, una matriz tridimensional osteoconductora, las moléculas de señalización para la osteoinducción y vascularización y estabilidad mecánica (Giannoudis, Einhorn, Schmidmaier, & Marsh, 2008).

1.2.1.1. Matrices tridimensionales

Son dispositivos que proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones y las señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión génica específica y que además, definen la arquitectura del tejido (Short, Brouard, Occhiodoro-Scott, Ramakrishnan, & Simmons, 2003). Las células interactúan con estos dispositivos de manera activa en el proceso de regeneración tisular, lo cual induce la liberación de factores de diferenciación y crecimiento, mientras que sintetizan su propia matriz extracelular (MEC), que proporciona un ambiente y arquitectura específicos del tejido y sirve como reservorio de agua, nutrientes, citocinas y factores de crecimiento, entre otros (Asahara & Kawamoto, 2004; Clarke & Frisen, 2001; Salgado et al., 2004).

Las matrices tridimensionales deben satisfacer ciertos criterios o propiedades esenciales:

Biocompatibilidad. Esto es, que permitan la integración adecuada al tejido hospedero sin generar efectos tóxicos (genotóxicos o citotóxicos) o causar respuesta inmune (Salgado et al., 2004).

Porosidad. Deben tener poros abiertos e interconectados, necesarios para la difusión de nutrientes y gases y para la remoción de desechos metabólicos como resultado de la actividad celular, lo cual es fundamental en el hueso, debido a sus características metabólicas, ya que se espera un alto porcentaje de transferencia de masa, incluso cuando se realizan ensayos *in vitro* (Salgado et al., 2004).

Propiedades de la superficie. Tanto las propiedades químicas como topográficas de la superficie pueden controlar y afectar la adhesión y proliferación celular. Las propiedades químicas están relacionadas con la habilidad de las células para adherirse al material. Las propiedades topográficas son fundamentales para la osteoconducción, que es el

proceso mediante el cual las células osteogénicas migran a la superficie de la matriz tridimensional a través de un coágulo de fibrina, que se establece después de implantado el material (Perin, Geng, & Willerson, 2003).

Osteoinductividad. Es el proceso mediante el cual las células madre y osteoprogenitoras son reclutadas en el sitio de regeneración ósea y estimuladas para diferenciarse hacia el linaje osteogénico.

Propiedades mecánicas. Depende del lugar de implantación y de las fuerzas mecánicas a las que se verá expuesto el implante.

Biodegradabilidad. Para la fabricación de las matrices se deben utilizar materiales que tengan porcentajes de resorción que igualen a los de formación ósea, de tal manera que para cuando la lesión esté totalmente regenerada, la matriz tridimensional se haya degradado totalmente.

Estructura del poro. Es una consideración importante en el desarrollo de una matriz para la ingeniería de tejidos. Los poros deben estar interconectados para permitir el crecimiento celular, la migración y el flujo de nutrientes. Si los poros son demasiado pequeños, la migración celular es limitada generándose una cápsula celular alrededor de los bordes de la matriz. Esto a su vez puede limitar la difusión de los nutrientes y la eliminación de los residuos metabólicos generando una región necrótica dentro del constructo. Por el contrario, si los poros son demasiado grandes hay una disminución en el área superficial limitando la adhesión celular.

Varios materiales de soporte se han desarrollado para la administración local de fármacos en los últimos años, los cuales los podemos clasificar en 4 categorías principales:

Polímeros naturales: Los polímeros naturales utilizados en ingeniería de tejidos ósea incluyen colágeno, fibrina, alginato, seda, ácido hialurónico, quitosano, entre otros. La mayoría son biocompatibles, biodegradables y solubles en los fluidos fisiológicos. Sin embargo poseen varias desventajas como su inmunogenicidad, la dificultad de procesamiento y el riesgo potencial de transmisión de patógenos (S. H. Lee & Shin, 2007; Schmidmaier, Schwabe, Strobel, & Wildemann, 2008).

Polímeros sintéticos: Los materiales sintéticos proporcionan realmente excelentes propiedades químicas y mecánicas que por lo general los polímeros naturales no poseen. Presentan menos peligro de inmunogenicidad y de transmisión de enfermedades, su ventaja radica en su procesabilidad y flexibilidad para adaptar la química apropiada y las propiedades mecánicas, teniendo mejores oportunidades para controlar pesos moleculares, grupos funcionales, configuraciones y conformaciones poliméricas y así determinar las características de degradación. Las desventajas incluyen la posible respuesta inflamatoria, potencial disminución del pH debido a la acidez relativa de hidrólisis, degradación de subproductos y función biológica limitada (S. H. Lee & Shin, 2007; Schmidmaier et al., 2008).

Materiales inorgánicos: Aunque la mayoría de compañías han producido sustitutos a partir de polímeros naturales y sintéticos, los materiales inorgánicos también se han utilizado para promover la formación de tejido óseo. (S. H. Lee & Shin, 2007). Entre ellos encontramos el fosfato de calcio, sulfato de calcio y vidrios bioactivos, entre otros. (Schmidmaier et al., 2008).

Composites: Consisten en la combinación de los materiales de las tres clases anteriores, por lo tanto se aprovechan las ventajas de los materiales individuales para optimizar otra clase de material (Schmidmaier et al., 2008).

1.2.1.2. Hidrogeles de Fibrina

Los hidrogeles son estructuras tridimensionales de redes de polímeros hidrófilos que contienen gran cantidad de agua, generalmente más del 50% del peso total. En escala macroscópica son sólidos, sin embargo en escala molecular se comportan como soluciones. Tienen diferentes propiedades dependiendo de su composición química, densidad de entrecruzamiento e hidrofobicidad. Con base en el polímero de origen los hidrogeles se pueden clasificar en naturales o sintéticos. Dentro de los hidrogeles naturales encontramos el hidrogel de fibrina.

El hidrogel de fibrina es probablemente uno de los más completos derivados del plasma sanguíneo en términos de su composición y aplicación clínica, ya que reproduce el último paso de la cascada de coagulación por la polimerización enzimática de fibrinógeno en presencia de trombina, permitiendo la formación de un coágulo semirígido que es de fácil consolidación y adherencia en el sitio de la aplicación (Radosevich, Goubran, & Burnouf, 1997; Standeven, Ariens, & Grant, 2005; Valbonesi, 2006). Además, es capaz de mantener los tejidos en la configuración requerida mientras ejerce sus propiedades hemostáticas y de cicatrización, es biocompatible, biodegradable y no induce respuesta inflamatoria ni reacción a cuerpo extraño (Radosevich et al., 1997).

En los últimos años los hidrogeles de fibrina han sido utilizados para diferentes aplicaciones en ingeniería de tejidos ya que mantienen su forma y estabilidad mecánica por largo tiempo *in vitro*, proporcionando el entorno y tiempo necesario para que las células proliferen y produzcan su propia matriz específica permitiendo así la migración, proliferación y diferenciación celular. También, presentan una rápida degradación *in vivo* facilitando la liberación de factores de crecimiento y células en el sitio de la herida (Eyrich et al., 2007).

Los hidrogeles de fibrina son utilizados como un portador autólogo de proteínas, ya que pueden ser producidos a partir de la propia sangre del paciente y por lo tanto no se esperan reacciones inflamatorias o tóxicas. La fibrina puede ser degradada por actividad enzimática durante la migración celular y cicatrización de heridas (Kuen Yong Lee, 2007). Se han descrito diferentes preparaciones de hidrogeles de fibrina para el cultivo y crecimiento de distintos tipos celulares como por ejemplo condrocitos para el desarrollo de tejido cartilaginoso (Eyrich et al., 2007), fibroblastos y queratinocitos para piel (Mazlyzam et al., 2007), células madre embrionarias (Willerth, Arendas, Gottlieb, & Sakiyama-Elbert, 2006) y células madre mesenquimales para el desarrollo de tejido óseo (Park, Kim, Moon, & Na, 2009; Yamada et al., 2003).

Existen sellantes de fibrina comercialmente disponibles los cuales tienden a contraerse y desintegrarse *in vitro* e *in vivo* después de unos pocos días y se disuelven casi completamente dentro de las primeras 3 - 4 semanas (Sidelmann, Gram, Jespersen, & Klufft, 2000). Un enfoque para extender la longevidad de la fibrina es el uso de inhibidores de la fibrinolisis, principalmente inhibidores de proteasas tales como la aprotinina o el ácido tranexámico que se añaden a los hidrogeles de fibrina como suplemento en el medio

de cultivo celular. Ellos pueden ayudar a la degradación lenta, con lo que parcialmente se estabiliza el hidrogel. Se sabe que la variación en los parámetros de gelificación tales como concentración de fibrinógeno, concentración de trombina y fuerza iónica, influyen enormemente las propiedades mecánicas, la estabilidad y la apariencia del gel (Eyrich et al., 2007).

Tayapongsak y colaboradores, utilizaron hidrogeles de fibrina autólogos mezclados con hueso particularizado para regeneración ósea. Ellos encontraron que esta combinación facilitaba la aplicación dentro de la cavidad ósea, previniendo el desplazamiento de las partículas óseas durante el acto quirúrgico, además concluyeron que el proceso de regeneración era más rápido por que ayuda a acelerar la migración celular y el proceso de revascularización (Tayapongsak, O'Brien, Monteiro, & Arceo-Diaz, 1994).

Thorn y colaboradores del departamento de cirugía oral y maxilofacial del Hospital Universitario de Copenhague, Dinamarca, describen el proceso de preparación de matrices de fibrina autóloga con factores de crecimiento plaquetarios, combinado con hueso medular particularizado en cirugía reconstructiva maxilofacial, en nueve pacientes que requerían reconstrucción de defectos óseos mandibulares por diferentes patologías. El hidrogel desarrollado en este estudio presenta una concentración de fibrinógeno 12 veces mayor y una concentración de factores de crecimiento plaquetario 8 veces mayor que las concentraciones de fibrinógeno y de factores de crecimiento plaquetario encontrados en el plasma rico en plaquetas. Los resultados mostraron que además de los beneficios físicos que proporciona usar el gel de fibrina en cirugía reconstructiva, también acelera el proceso de cicatrización del injerto ya que actúa como matriz para la invasión celular y como conductor de la formación ósea. Además, reportan que la utilización de este hidrogel mezclado con hueso particularizado en cirugía maxilofacial reconstructiva, es una herramienta útil para las reconstrucciones mandibulares lográndose reestablecer la forma, en altura y espesor del reborde mandibular injertado (Thorn, Sorensen, Weis-Fogh, & Andersen, 2004).

Keun-Hong Park y colaboradores evaluaron la viabilidad de formación de hueso ectópico en una matriz tridimensional de fibrina mezclado con nanopartículas de BMP-2 y MSCs, demostrando que la BMP-2 induce la diferenciación osteogénica de las MSCs con formación de hueso de manera homogénea en todo en el injerto concluyendo que el constructo de matriz de fibrina, MSCs y BMP-2 constituye un método prometedor para mejorar el proceso de regeneración ósea (Park et al., 2009). Estos y otros reportes donde se utilizan los hidrogeles de fibrina para el mantenimiento y diferenciación celular para posibles aplicaciones en medicina regenerativa están resumidos en la Tabla 1.1.

1.2.1.3. Factores de crecimiento

Los diferentes tipos de factores de crecimiento ejercen su función a determinadas concentraciones activando receptores específicos en las células diana. Estas moléculas pueden actuar estimulando o inhibiendo la división celular, la diferenciación, la migración y la expresión génica. Por lo tanto, estas moléculas son esenciales para la formación de tejidos y juegan un papel importante en la ingeniería tisular. Dentro de las propuestas para la aplicación de factores de crecimiento potencialmente aplicables en ingeniería de

tejidos ósea tenemos: VEGF, TGF- β , PDGF, FGF-2, IL-1, IL-6 y las BMPs (Salgado et al., 2004).

Tabla 1.1. Utilización de hidrogeles de fibrina para medicina regenerativa ósea y cartilaginosa

ESTUDIO	HIDROGEL FIBRINA	TIPO CELULAR	CARACTERÍSTICAS Y CONCLUSIONES
<i>(Linnes, Ratner, & Giachelli, 2007)</i>	Fibrinógeno bovino	NIH-3T3	Se describe una nueva técnica para la elaboración de una matriz de fibrina que provee fuerza mecánica y flexibilidad así como gran área superficial para la adhesión celular, crecimiento y difusión de nutrientes
<i>(Yamada, Fujimoto, Ito, Yoshimi, & Ueda, 2006)</i>	Gel de fibrina pasteurizada (Bolheal)	BM- MSC	La combinación de MSC con β -TCP mezclado en un hidrogel de fibrina es una formulación exitosa para la formación de tejido óseo heteroectópico. actuando como un sustituto óseo inyectable creando una técnica mínimamente invasiva para la reconstrucción de defectos óseos maxilofaciales.
<i>(Im, 2005)</i>	Fibrinógeno equino	AD-MSC BM-MSC	El potencial condrogénico de las AD-MSC difieren de el potencial de las BM-MSC. Aunque producen igual cantidad de factores bioactivos, las AD-MSC tienen una capacidad de diferenciación a cartílago menor que las BM-MSC.
<i>(Bensaid et al., 2003)</i>	Gel de fibrina Tissucol®	BM-MSC	El gel de fibrina constituye una matriz adecuada para el crecimiento y proliferación de la MSC y para la diferenciación osteogénica in vitro.
<i>(O. K. Lee, 2008)</i>	Fibrina autóloga	-	La matriz de fibrina proporciona el soporte necesario para el mantenimiento y diferenciación celular facilitando la formación de nuevo tejido óseo.
<i>(Eyrich et al., 2007)</i>	Gel de fibrina Tissucol®	Condrocitos	Este estudio demostró la idoneidad del gel de fibrina para la formación de cartílago sugiriendo su aplicación en ingeniería de tejidos.
<i>(Thorn et al., 2004)</i>	Fibrina autóloga	-	Se describe el método para la preparación de fibrina autóloga con factores de crecimiento plaquetario con hueso canceloso particularizado como una herramienta efectiva para la cirugía reconstructiva máxilofacial

El VEGF es un potente factor angiogénico que se encuentra comúnmente en el sitio de la consolidación de las fracturas óseas y en el cartílago en crecimiento, regula la vascularización a través del reclutamiento de las células endoteliales al sitio de la curación de la herida y también juega un papel importante en la regulación entre la osteogénesis y la angiogénesis. El FGF-2, es otra citoquina involucrada en el proceso de remodelación ósea. Se cree que está implicado en la regulación del mantenimiento del delicado equilibrio entre las células formadoras de hueso y las células que reabsorben el hueso. Así mismo, promueve el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y estimula el fenotipo osteogénico mediante la activación del factor de transcripción nuclear Cbaf-1/Runx2. El PDGF, es producido por osteoblastos, plaquetas y monocitos/macrófagos, incrementa la osteoinducción de la matriz ósea no mineralizada y estimula la migración de las MSCs a los sitios de curación de heridas (Salgado et al., 2004). Las BMPs son un grupo de factores de crecimiento filogenéticamente conservado de 20 miembros que constituyen un gran subgrupo de la superfamilia del TGF β . Mas de 40 años han pasado desde que Marshall Urist descubrió las BMPs (Mori et al., 2010) y aunque inicialmente se detectaron por su habilidad directa de formar hueso de forma ectópica, de ahí su nombre, ahora es conocido que las BMPs regulan los mas variados procesos morfogenéticos del desarrollo (Bragdon et al.; Ripamonti & Petit, 2009). Aunque hay una amplia gama de BMPs descritas en la literatura, las BMPs 2,4,6 y 7 (también llamada OP-1) son generalmente consideradas como osteoinductivas ya que su función principal es reclutar células mesenquimales al sitio de la lesión y luego estimular su proliferación y diferenciación hacia el linaje osteogénico. Los mecanismos por los cuales actúan sobre las células madre mesenquimales no se entienden totalmente, pero se sabe que por ejemplo, la BMP-2 juega un papel importante en la expresión de marcadores osteogénicos tales como fosfatasa alcalina y osteoclastina (Salgado et al., 2004) y la BMP 4 estimula la migración y diferenciación celular hacia cartílago y tejido óseo (Mori et al., 2010). La BMP-2, BMP-4 y BMP-7 se expresan tanto en la osificación intramembranosa como endocondral, con diferente intensidad espacio temporal.

Un salto cuántico hacia la comprensión del fenómeno de formación de tejido óseo por inducción, se ha logrado gracias al a extracción disociativa de las glicoproteínas osteogénicas a partir de la matriz de colágeno de los huesos y al observar que cuando se implanta heterotópicamente la matriz colágena sin estas glicoproteínas es no inductiva por si sola. Sin embargo, la combinación de estas glicoproteínas con la matriz colágena en el laboratorio y la implantación de este constructo de forma heterotópica desencadena la cascada de inducción ósea. La purificación de estas glicoproteínas extraídas ha dado origen a las isoformas de homólogos moleculares de origen natural de las BMPs. Estas han sido posteriormente secuenciados por clonación molecular y se han creado las proteínas recombinantes humanas, dos de las cuales (BMP-7 y BMP-2) ya se encuentran comercialmente disponibles y autorizadas para el uso en humanos (Carstens, Chin, & Li, 2005; Heliotis et al., 2009; Nagao et al., 2002).

1.2.1.4. Aplicación de células en ingeniería de tejidos

El próximo paso después de desarrollar una adecuada matriz tridimensional es elegir una fuente segura de células que permitan su aislamiento y expansión. De hecho, una fuente ideal de células debe ser fácilmente expandible, no inmunogénica y con un patrón de expresión proteica similar a las del tejido a regenerar (Heath, 2000).

Una de las primeras opciones fue la utilización de osteoblastos aislados de biopsias tomadas de los pacientes (células autólogas), seguida de su expansión *in vitro*. Sin embargo, esta metodología tiene varias limitaciones: consume mucho tiempo para obtener relativamente pocas células después de la disociación del tejido, ya que su porcentaje de expansión es relativamente bajo, restringiendo de este modo la cantidad de células disponibles para cultivar en las matrices tridimensionales. Una alternativa a esta metodología se refiere al uso de células obtenidas a partir de donantes no humanos (células xenogénicas) que solucionaría el problema de los bajos rendimientos numéricos. Sin embargo, la inmunogenicidad de estas células, las posibilidades de transmisión de agentes infecciosos y los problemas éticos y sociales relacionados con este tema han disminuido el entusiasmo por este enfoque. A partir de este contexto aparecen las células madre como una estrategia terapéutica más válida y prometedora para la regeneración de tejido óseo.

A continuación describiremos detalladamente que son las células madre, como se clasifican, sus propiedades biológicas y su aplicación en la medicina regenerativa.

1.2.2. Células Madre Mesenquimales

El concepto de célula madre como tal, no es nuevo y se encuentra ya presente en la literatura científica y médica desde el siglo XIX (Gorodetsky et al., 1999). Dos características definen a la célula madre: En primer lugar su capacidad de autorreplicación y en segundo lugar, su capacidad de diferenciación dando origen a uno o más tipos o linajes celulares. Por lo tanto, el concepto de célula madre incluye un amplio rango de células con diferentes capacidades de proliferación y diferenciación (Gurevich et al., 2002; Mol et al., 2005). Las células madre se han clasificado de acuerdo con diferentes criterios: En primer lugar, de acuerdo con su capacidad de diferenciación, se clasifican como *Totipotentes*, aquellas con capacidad para dar origen a un organismo completo incluyendo el tejido germinal; *Pluripotentes*, las células que son capaces de dar origen a células de las tres capas germinales y *Multipotentes*, u órgano específico, las que dan origen a células de un tejido u órgano particular. Las células madre pueden también clasificarse de acuerdo con su origen en *células madre embrionarias (ES)*, que se obtienen de la masa celular interna del blastocisto, *células madre germinales embrionarias*, que se obtienen de la cresta gonadal del feto y *células madre adultas (ASCs)*, que se originan de tejidos adultos maduros. Cada uno de estos tipos celulares tiene características diferentes y por lo tanto, dependiendo de las circunstancias, ventajas o desventajas, frente a las demás (Merchant & Flake, 2004)

La principal fuente de ASCs es la médula ósea que contiene no sólo células madre hematopoyéticas (HSCs) sino además, una subpoblación celular mesenquimal, que puede diferenciarse *in vitro* e *in vivo* a osteoblastos, condroblastos, fibroblastos, adipocitos

y mioblastos, denominadas Células Madre Mesenquimales (MSCs) (Asahara & Kawamoto, 2004; Clarke & Frisen, 2001; Gorodetsky et al.; Gurevich et al., 2002; Y. Jiang et al., 2002; Lind, 1996; Linnes et al., 2007; Osathanon et al., 2008; Perin et al., 2003; Salem & Thiernermann, 2010; Short et al., 2003).

Dado su importante potencial terapéutico, y con el fin de poder comparar los resultados de los diversos estudios, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, del inglés International Society for Cellular Therapy) ha propuesto tres criterios mínimos para definir las MSCs humanas. El primero corresponde a la capacidad de adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar; el segundo, al fenotipo celular determinado idealmente por citometría de flujo donde las MSCs deben expresar CD105, CD73 y CD90, y no expresar CD45, CD34, CD14, entre otros antígenos hematopoyéticos; y el tercero, que hace referencia a la demostración de su potencial de diferenciación *in vitro*, típicamente hacia linajes osteogénico, condrogénico, adipogénico y músculo estriado (Isaacson & Herman, 1996; Meirelles Lda, Fontes, Covas, & Caplan, 2009; Salem & Thiernermann).

Tradicionalmente, la médula ósea fue considerada como la fuente principal para el aislamiento de las células madre mesenquimales (Salem & Thiernermann, 2010), aunque conforman tan solo el 0,001 - 0,01% de la población total de las células nucleadas de la médula ósea (Pittenger et al., 1999). También se ha aislado este tipo celular de otras fuentes como la sangre de cordón umbilical, sangre periférica (Roufosse, Direkze, Otto, & Wright, 2004), tejido adiposo (Dicker et al., 2005; Levi & Longaker, 2010; Levi et al., 2010), folículo capilar (Shih et al., 2005), ligamento periodontal (Yang, Rossi, & Putnins) (Ishikawa et al., 2009; Kawanabe et al.; N. H. Lin, Gronthos, & Mark Bartold, 2009), tejido gingival (Mitrano et al.) y pulpa dental (Yamada et al., 2006), entre otros.

El tejido adiposo humano se deriva del mesodermo embrionario y contiene en su estroma células madre multipotentes que pueden diferenciarse hacia linajes específicos como adipogénico, condrogénico, osteogénico, miogénico y neurogénico. Estas células se han denominado células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Ad-MSC) y poseen un potencial de diferenciación y características similares a las células madre mesenquimales obtenidas a partir de la médula ósea (BM-MSC) (Cui et al., 2007; Peroni et al., 2008; Ryu et al., 2005; Stewart & Stewart, 2011). Debido a la amplia distribución corporal del tejido adiposo, éste se constituye en una fuente abundante de MSCs, accesible con métodos mínimamente invasivos y que ha demostrado ser de fácil aislamiento y preparación *in vitro*.

1.2.2.1. Mecanismos de acción

El enfoque inicial del uso de las MSCs en el tratamiento de lesiones músculo esqueléticas se basó en la capacidad que ellas tienen de diferenciarse en diferentes tipos celulares. En esencia, la expectativa era que implantando o inyectando células madre mesenquimales se lograría la colonización en el sitio de la lesión y posteriormente ellas se diferenciarían en los tejidos mesenquimales apropiados promoviendo el proceso de reparación.

El anterior concepto del mecanismo de acción de las MSCs es discutido actualmente por la comunidad científica, cambiando el paradigma de que el efecto reparador de estas células esta centrado en su implantación y posterior diferenciación órgano específica, para ampliarlo con un mecanismo alternativo denominado efecto paracrino, en el cual las MSCs secretan moléculas biológicamente activas que ejercen efectos benéficos sobre otras células promoviendo la angiogénesis, la regeneración tisular e inhibiendo la fibrosis, la apoptosis y la inflamación.

Las investigaciones actuales sugieren que los mecanismos implicados en mejorar la reparación de los tejidos dañados son dos: la diferenciación celular contribuye a la reparación tisular mientras que la señalización paracrina regula las respuestas locales a las lesiones. Los efectos paracrinos pueden ser divididos en tróficos, inmunomoduladores, antifibróticos y quimioatrayentes. Los efectos tróficos pueden ser posteriormente subdivididos en antiapoptóticos, de crecimiento y diferenciación.

1.2.2.2. Propiedades biológicas de las células madre mesenquimales

Efecto Trófico

Las MSCs tienen la capacidad de migrar preferencialmente hacia los sitios lesionados. Esta propiedad se le ha atribuido a la expresión de factores de crecimiento, quimioquinas y receptores de la matriz extracelular en la superficie de las células madre. Ensayos de quimioatracción in vitro han demostrado que las MSCs migran hacia diferentes factores de crecimiento y quimioquinas de manera dosis dependiente. Esta migración es estimulada por factores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), por la expresión de moléculas de superficie endotelial como moléculas de adhesión celular vascular (VCAM-1) y la E-Selectina (CD62E) que permiten el acoplamiento de las células madre circundantes y por proteínas como la osteopontina, cuya expresión está aumentada en osteocitos en condiciones de hipoxia.

Esta habilidad preferencial de dirigirse hacia los sitios de daño tisular, aumenta las propiedades regenerativas de las MSCs así como incrementa la probabilidad de que al aplicar sistémicamente las células ellas encuentren las áreas donde se necesita su efecto, siendo de particular interés para la aplicación clínica (Meirelles Lda et al., 2009).

Propiedades antiapoptóticas

Al analizar las moléculas secretadas por las MSCs se ha identificado la presencia de factores que mejoran el crecimiento y la supervivencia de las células endoteliales como por ejemplo el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1). Estas moléculas antiapoptóticas disminuyen el grado de muerte celular en los tejidos que rodean las áreas lesionadas reduciendo la necrosis y mejorando la perfusión tisular (Meirelles Lda et al., 2009).

Propiedades Inmunomoduladoras

Las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs se han demostrado en múltiples trabajos, por ejemplo, los de Di Nicola en el 2002 (Di Nicola et al., 2002), Krampera en el 2003 (Krampera et al., 2003), Rasmusson en el 2007 y Martinet en el 2009 (Rasmusson,

Uhlen, Le Blanc, & Levitsky, 2007) ((Martinet et al., 2009), citados en da Silva Meirelles, donde reportan que las MSCs pueden inhibir la proliferación de células T, inhibir o promover la proliferación de células B, suprimen la activación de las células Natural Killer (NK), modulan el perfil de secreción de citoquinas de las células dendríticas y de los macrófagos proporcionando una influencia indirecta sobre el sistema inmunológico, inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias, la producción de anticuerpos por parte de las células B e inhiben la generación y función de las células presentadoras de antígeno (Hoogduijn et al., 2010; Meirelles Lda et al., 2009).

La inmunosupresión no es el único aspecto de la capacidad inmunomoduladora de las MSCs. Bajo condiciones de reposo inmunológico, las MSCs promueven la supervivencia de los linfocitos T y pueden estimular la activación y proliferación de células T CD4+. Además, las MSCs no expresan antígeno mayor de histocompatibilidad clase II, ni la mayoría de las moléculas co-estimuladoras clásicas como CD80, CD86, o CD40 (Salem & Thiernemann, 2010).

Propiedades Angiogénicas

El aporte proporcionado por las MSCs a la angiogénesis debe ser considerado como uno de los efectos más favorables, porque el reestablecimiento del suministro del flujo sanguíneo es fundamental para la recuperación de los tejidos dañados. En nuestro grupo de investigación hemos demostrado el efecto proangiogénico que tienen los medios condicionados producidos por las Ad-MSCs en condiciones de hipoxia en un modelo in vitro tridimensional, encontrando que bajo estas condiciones secretan mayor cantidad de factores angiogénicos, promoviendo una mayor formación de micro capilares y mayor angiogénesis que las MSCs derivadas de médula ósea (Doncel A, 2010).

Los Medios Condicionados (MC) son los medios en los que se han cultivado células por un determinado tiempo, los cuales contienen factores de crecimiento y citoquinas secretadas por las células cultivadas y liberadas al medio, responsables de la actividad biológica de los mismos y que pueden promover el crecimiento de nuevas células, la proliferación celular y la angiogénesis, mejorando y acelerando la curación de las heridas, aumentando la capacidad de reparación y regeneración de tejidos no hematopoyéticos (Chen, Tredget, Wu, & Wu, 2008; Kim et al., 2006; Short et al., 2003). Los MC de las MSCs tienen un efecto similar a las MSCs en el proceso de reepitelización, además ejercen in vivo un efecto quimioatractivo para macrófagos, células endoteliales y queratinocitos epidérmicos y pueden también regular la migración celular de fibroblastos acelerando el cierre de las heridas al incrementar la producción de colágeno I por parte de los fibroblastos. Estos efectos se han evidenciado tanto con MC de MSCs de médula ósea como de tejido adiposo (Chen et al., 2008; Hocking & Gibran, 2010; Kim et al., 2006; O. K. Lee, 2008).

Propiedades antifibróticas

Las metaloproteinasas presentes en los MC, tienen un efecto antifibrótico degradando la matriz extracelular, promoviendo la liberación de factores proangiogénicos como VEGF, TGF- β y de inhibidores tisulares naturales que controlan la degradación de la matriz extracelular y la remodelación de colaterales (Hobeika, Edlin, Muhs, Sadek, & Gagne, 2008; van Poll et al., 2008). Se ha demostrado el efecto paracrino de BM-MSCs

a través de IL-10 y TNF- β que inhiben el desarrollo de fibrosis en el hígado (Parekkadan et al., 2007).

Quimioatracción

Las MSCs en cultivo secretan una variedad de moléculas quimiotácticas que incluyen MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, RANTES, MCP-3, MIP-3a, eotaxina-3, fractalquina, ENA-78, i-CAT, Groa, SDF-1, IL-8 y IP-10. Las células diana para estas moléculas incluyen a los monocitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células T de memoria, células B, células NK, células dendríticas, progenitores hematopoyéticos y células endoteliales. Aunque estas moléculas se expresan constitutivamente por las MSCs en cultivo, es probable que el patrón de expresión de estas quimioquinas sea modificada por la exposición a otros tipos de células, particularmente células inmunes (Meirelles Lda et al., 2009).

1.3. Aplicación de Células Madre Mesenquimales para la regeneración ósea

Las investigaciones actuales continúan promoviendo que el modelo ideal de la ingeniería tisular para lograr la reconstrucción ósea es mediante la promoción de la osteogénesis in situ. Este concepto implica la entrega directa de células osteogénicas en el sitio del defecto óseo con ayuda de una matriz y factores de crecimiento (Khojasteh, Behnia, Dashti, & Stevens, 2011).

La capacidad de proliferación y de diferenciación osteogénica de las MSCs está científicamente establecida (Slater, Kwan, Gupta, Panetta, & Longaker, 2008) (Chamberlain, Fox, Ashton, & Middleton, 2007; Phinney & Prockop, 2007). Los análisis in vitro demuestran que las MSCs al ser inducidas con medio de diferenciación osteogénico incrementan la expresión de marcadores de diferenciación como la fosfatasa alcalina, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína ósea y se detecta la presencia de depósitos de calcio en la matriz extracelular, como se resume en la **Tabla 1.2**.

En el progreso del estudio de la biología del tejido óseo y gracias al aislamiento y cultivo in vitro de las MSCs, se abrió la posibilidad de estudiar los mecanismos moleculares y biológicos de la regeneración ósea en modelos animales obteniendo avances significativos, como lo demuestran las más de dos mil publicaciones de estudios experimentales que reportan que la aplicación de las MSCs en defectos óseos en modelos animales aumenta la osteogénesis promoviendo el proceso de regeneración ósea (**Tabla 1.3**).

Tabla 1.2. Ensayos in vitro del potencial osteogénico de las células madre mesenquimales

ESTUDIO	MSCs	MATRIZ	FACTOR DE CRECIMIENTO	CONCLUSIONES
<i>(Huang, Ren, Ma, Smith, & Goodman, 2010)</i>	BM-MSC	Monocapa	VEGF, IGF-1, FGF-2, BMP-2	IGF-1 y FGF-2 son esenciales para la osteogénesis de las MSC. La adición de BMP-2 y VEGF mejora la osteogénesis
<i>(Schneider et al., 2010)</i>	BM-MSC UC-MSC	Colágeno tipo I y III	-	A partir de los dos tipos celulares BM- MSC y UC- MSC se generan osteoblastos funcionales pero sugieren que este proceso se da a través de diferentes mecanismos
<i>(Chevallier et al., 2010)</i>	BM-MSC	Monocapa	-	Al cultivar las MSC con lisado de plaquetas humanas en vez de suero fetal bovino se encontró que las células presenta una tasa de expansión mas alta y una inducción espontánea a la inducción de genes de diferenciación osteoblástica
<i>(Donzelli et al., 2007)</i>	BM-MSC	Colágeno (Gingostat®)	-	Las BM- MSC lograron una buena distribución y diferenciación osteogénica en la matriz de colágeno, pero el corto tiempo de degradación de la matriz limita la futura aplicación en regeneración ósea.
<i>(Hoemann, El-Gabalawy, & McKee, 2009)</i>	BM- MSC	Colágeno tipo I	-	Se compararon los niveles de fosfatasa alcalina de células de calvario, líneas celulares de calvaria y BM- MSC después de la inducción osteogénica encontrando que Los niveles de expresión de fosfatasa alcalina presentan una progresión similar a través del tiempo pero no son proporcionales con los niveles de mineralización.

Tabla 1.3. Estudios realizados en modelo animal de la aplicación de células madre mesenquimales para la regeneración del tejido óseo

ESTUDIO	MODELO ANIMAL	FUENTE DE MSC	MATRIZ	FAC-TORES	CONCLUSIONES
<i>(Degano et al., 2008)</i>	Ratón (Calvaria)	BH-MS AD-MS	Hidrogel arginina-glicina-aspartato	-	Las BM-MS sobreviven mejor que las AD-MS en el Hidrogel
<i>(Li et al., 2007)</i>	Perro (Cubito)	AD-MS	β Tricalcío fosfato (TCP)	BMP-2	Las AD-MS y BMP-2 producen un incremento significativo en la formación de nuevo tejido óseo reparando parcial y totalmente el defecto crítico de huesos largos.
<i>(Kanczler et al., 2008)</i>	Ratón (Fémur)	BM-MS	Poly - DL ácido láctico (PLA)	VEGF	Los factores de crecimiento en combinación con MS en una matriz pueden mejorar el mecanismo de reparación de defectos óseos de tamaño crítico
<i>(Yang et al., 2010)</i>	Conejo (Periodonto)	BM-MS	Gelatina	-	Mejora la regeneración de tejidos duros y blandos periodontales: hueso, cemento y ligamento periodontal.
<i>(Ben-David et al., 2011)</i>	Conejo (Defectos óseos craneales)	BM-MS	Hidrogel basado en gelatina	-	El hidrogel permite la proliferación y diferenciación de las MS in vitro e incrementa sustancialmente la formación de tejido óseo in vivo.
<i>(Yoshikawa et al., 2001)</i>	Ratas (Subcutánea)	BM-MS	Hidroxiapatita	BMP	Los resultados demostraron la capacidad de las BM-MS para la regeneración de tejido óseo heterotópico
<i>(X. Jiang et al., 2006)</i>	Conejos (Mandíbula)	BM-MS	Hueso orgánico no natural (NNB)	hBMP-4	La MS con ayuda de la hBMP-4 aumenta la capacidad osteogénica inherente de las MS
<i>(Niemeyer et al., 2010)</i>	Oveja (Tibia)	BM-MS AD-MS	Esponjas de colágeno mineralizadas	PRP	Las AD-MS presentan menor potencial osteogénico que las BM-MS, el cual se iguala si se utiliza un coadyudante como el PRP.

Tabla 1.3. Estudios realizados en modelo animal de la aplicación de células madre mesenquimales para la regeneración del tejido óseo

ESTUDIO	MODELO ANIMAL	FUENTE DE MSC	MATRIZ	FAC-TORES	CONCLUSIONES
<i>(L. T. Lee, Kwan, Chen, & Wong, 2008)</i>	Conejos (Cráneo)	BM-MSC	Gel de fibrina autóloga Matriz Macroporosa de fosfato de calcio bifásico (MBCP)	-	Las células en el gel de fibrina mostraron una mejor inducción para la formación ósea. La matriz (MBCP) con y sin células mostró una menor regeneración ósea. y una mayor reacción tisular inflamatoria que el gel de fibrina
<i>(Liu, Zhou, Feng, Ma, & Ni, 2008)</i>	Ratón (Subcutáneo)	AD-MSC	-	PRP	El nuevo sistema inyectable conformado por AD-MSC y PRP produce formación de hueso de manera heterotópica.
<i>(Pieri et al., 2009)</i>	Minicerdos (Mandíbula)	BM-MSC	Fluor-hidroxiapatita (FHA)	PRP	La adición de MSC a la matriz FHA con PRP aumenta el proceso de regeneración ósea.
<i>(Cui et al., 2007)</i>	Canino (Calvaria)	AD-MSC	coral	-	Las AD-MSC sobre una matriz de coral mejora sustancialmente el proceso de reparación ósea. Indicando que ellas podrían ser una fuente celular para la regeneración ósea clínica en humanos.
<i>(C. Y. Lin et al., 2010)</i>	Conejo (Fémur)	BM-MSC	-	VEGF/BMP-2	Las BM-MSC que expresan VEGF/BMP-2 aceleran el proceso de reparación ósea en defectos de huesos largos mejorando la calidad del hueso regenerado.
<i>(Zhang et al., 2010)</i>	Rata (Fémur)	MSC	Poli-ε-caprolactona tricálcio fosfato	-	Las MSC median la regeneración tisular por neovascularización a través de mecanismos no determinados .
<i>(Burastero et al.)</i>	Rata (Fémur)	BM-MSC	Orthoss®	BMP-7	La asociación in vitro de BMP-7 y BM-MSC provee una mejor osteoinductividad del injerto comparado con cada una de ellas solas.
<i>(Pieri et al., 2010)</i>	Conejo (Calvarium)	AD-MSC	Hueso inorgánico bovino	-	Las AD-MSC aumentan la formación de nuevo tejido óseo y la oseointegración del implante de manera dosis dependiente: a mayor cantidad de células hay una mayor neoformación de tejido óseo

La terapia celular utilizando células madre adultas, células multipotentes con capacidad de promover angiogénesis, diferenciarse para producir diversos tipos de tejido conectivo y regular la respuesta inflamatoria e inmunológica, son centro de una multitud de estudios clínicos actualmente en curso. Existe gran cantidad de evidencia científica que demuestra el potencial terapéutico de las MSCs en la reparación y regeneración de los tejidos lesionados por heridas o enfermedad en casi todos los órganos del cuerpo, incluyendo corazón, cerebro, pulmón, hígado, riñones, ojos, piel y tejido óseo y cartilaginoso. Estos datos demuestran su eficacia y su amplia aplicabilidad, lo que ha motivado el rápido desarrollo de terapias basadas en MSCs como lo indican los más de doscientos treinta ensayos clínicos que figuran actualmente en la página de los ensayos clínicos del NIH (Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU.) (www.clinicaltrials.gov, 2012) entre los cuales se encuentran reportados los siguientes estudios clínicos en donde se están utilizando las MSCs para regeneración ósea, específicamente:

1. “Implante autólogo de células madre mesenquimales para el tratamiento de fracturas distales de tibia”, el cual ya fue finalizado pero sus resultados no han sido publicados en la literatura.
2. “Tratamiento de nonión de fracturas atróficas con implante de células madre mesenquimales con injerto percutáneo” Que inicia en Junio de 2012 y finaliza en Julio de 2016 .
3. “Efectividad de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo como componente de un injerto composite (ROBUST)” el cual inicia en Junio de 2012 .
4. “Tratamiento de la no unión de fracturas de huesos largos con células madre mesenquimales autólogas” el cual fue finalizado en diciembre de 2011 y todavía no se encuentra publicado en la literatura.
5. “Ensayos clínicos de regeneración de tejido periodontal” ya completado en 2009, sin publicaciones disponibles.
6. “Tratamiento de osteogénesis imperfecta severa con tranplante de médula ósea alogénica” completado en 2008, sin publicaciones.
7. “El efecto de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en la enfermedad de Romberg” completado en marzo de 2011 y no se encuentra publicado en la literatura.
8. “Terapia con células mesenquimales de médula para la osteogénesis imperfecta: un estudio piloto” completado en 2008, sin publicaciones.

Desde que se describieron por primera vez, en 1987 (Friedenstein, Chailakhyan, & Gerasimov, 1987), las MSCs se han considerado candidatos ideales para la ingeniería de tejidos mesenquimales como el hueso y el cartílago. Sin embargo, hasta el momento, en la búsqueda de la combinación ideal para la ingeniería del tejido óseo, ni el tipo de células ni el biomaterial de soporte están completamente definidos. La capacidad de proliferación y de diferenciación osteogénica, han convertido a las MSCs en la principal contribuyente de los procedimientos de regeneración ósea y el futuro de la reconstrucción ósea inducida de novo.

La primera serie de casos clínicos que demostró la viabilidad de la ingeniería tisular con MSCs, como una alternativa a los injertos óseos autólogos para el tratamiento de huesos

largos, se informó por Quarto y colaboradores en 2001, quienes describen los resultados preliminares de tres pacientes. El primero, una mujer de 41 años de edad, con un defecto óseo de 4 cm en la tibia derecha, el segundo, una mujer de 16 años de edad con una pérdida traumática de un segmento de 4 cm de longitud en la diáfisis distal del cubito derecho y el tercero un paciente masculino de 22 años de edad, quien perdió un segmento de 7 cm del húmero derecho. Todos tres tratados con procedimientos quirúrgicos convencionales los cuales habían fracasado. Para todos los pacientes se utilizaron matrices de hidroxiapatita cargadas con MSCs autólogas de médula ósea. Los tres pacientes fueron monitorizados con radiografías y tomografías computarizadas, que revelaron la formación de callo óseo abundante después del segundo mes de la cirugía. La evaluación angiográfica a los 3 y 6,5 años después de la cirugía indicaron vascularización de la zona del injerto óseo. Sin embargo, los autores reconocen que debido a la alta densidad de la matriz de hidroxiapatita fue difícil la evaluación radiográfica (Quarto et al., 2001).

Hibi y colaboradores, realizaron la reconstrucción de una hendidura alveolar mediante la inyección de plasma rico en plaquetas autólogo con células madre de médula ósea previamente inducidas hacia el linaje osteogénico. Este estudio proporciona un nuevo enfoque de la utilización del plasma rico en plaquetas como un material autólogo para el soporte de células. Durante el seguimiento tomográfico observaron regeneración tisular en las paredes de la hendidura después de tres meses y reducción de la fisura después de seis meses. No está claro si el defecto es llenado por las células madre implantadas o por la osteoconducción (Hibi, Yamada, Ueda, & Endo, 2006). En el 2010 Lee y cols, describen una reconstrucción mandibular exitosa seguida de la colocación de implantes dentales de un defecto óseo de 15 cm como consecuencia de una mandibulectomía segmentaria por un hemangioma central en un niño de 14 años de edad. Tres cirugías reconstructivas se le realizaron y en la última se colocaron las células madre encontrando histológicamente hueso laminar vital alrededor de los implantes dentales.

En 2009, Mesimaki y colaboradores, reconstruyeron un gran defecto óseo maxilar de un paciente adulto con Ad-MSC autólogas combinadas con rhBMP-2 y gránulos de β -TCP (β Fosfato tricálcico). Después de aislar las Ad-MSC de la grasa abdominal subcutánea en suero autólogo utilizando instalaciones GMP, las células fueron sembradas en las matrices β -TCP. Antes de la combinación con las células, las matrices se incubaron durante 48 horas en el medio basal suplementado con rhBMP-2. Las células se mantuvieron en las matrices durante 48 horas antes de su colocación en soportes de titanio y posterior implantación en la zona lateral del músculo recto abdominal. 8 meses después se examinó microscópicamente la formación de hueso maduro normal. Posteriormente se realizó un colgajo microvascularizado y todo junto se colocó en el defecto maxilar, los vasos abdominales se anastomosaron con los faciales y el músculo se deja epitelializar intraoralmente. Después de dos meses se alcanzó la forma y la densidad ósea normal en el maxilar reconstruido, sin embargo la contribución relativa de la rhBMP-2 y de las MSCs en la formación de el hueso nuevo está aún por confirmar (Mesimaki et al., 2009).

Meijer y colaboradores, en el 2008, evaluaron el proceso de reparación ósea de defectos intraorales de 6 pacientes al implantar un sustituto óseo formado por células madre mesenquimales derivadas de medula ósea autóloga mezclada con cristales de hidroxiapati-

ta. Aunque las biopsias tomadas 4 meses después de la reconstrucción del defecto óseo intraoral, mostraron formación ósea en tres pacientes, solamente uno mostró formación ósea a partir de las células implantadas (osteogénesis) y no por inducción de las células ubicadas en los bordes del defecto óseo (osteoconducción) (Meijer, de Bruijn, Koole, & van Blitterswijk, 2008). Una visión general de los ensayos clínicos publicados se presentan en la **Tabla 1.4**.

Tabla 1.4. Estudios clínicos realizados en humanos aplicando células madre mesenquimales en regeneración de tejido óseo

ESTUDIO	DEFECTO ÓSEO	MSC	MATRIZ	CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO CONCLUSIONES
<i>(Behnia, Khojasteh, Soleimani, Tehranchi, & Atashi, 2011)</i>	Defectos alveolares secuelas de labio y paladar hendido	BM- MSC	Hidroxiapatita β - Fosfato tricálcico	Mostró una regeneración ósea entre el 34,5% y 25,6% después de 4 meses El uso del factor de crecimiento derivado de plaquetas aumenta la capacidad de regeneración de las MSC
<i>(Meijer et al., 2008)</i>	Defectos óseos mandibulares intraorales	BM- MSC	Hidroxiapatita	Único estudio que logró cuantificar la cantidad de hueso neoformado y su ubicación en la matriz De seis pacientes hubo regeneración ósea en tres de ellos, cuestionando la predicibilidad de el método
<i>(Mesimaki et al., 2009)</i>	Reconstrucción mandibular	AD- MSC	β - Fosfato tricálcico	Primer estudio clínico que utiliza MSCs derivadas de tejido adiposo expandidas con buenas prácticas de manufactura (GMP) Uso de rhBMP-2 para promover la formación ósea in vivo Utilización de colgajo microvascularizado en la reconstrucción ósea. El efecto trófico de las MSC y la osteoconductividad de la matriz actúan sinérgicamente para producir un buen proceso de osificación.
<i>(Wongchuensoontorn et al., 2009)</i>	Fractura mandibular	BM- MSC	Injerto óseo autólogo particularizado	La adición de MSCs mejora el proceso de cicatrización ósea
<i>(Mendoza Jose J., 2010)</i>	Osteoradionecrosis mandibular	BM- MSC	β - Fosfato Tricálcico – Hidroxiapatita PRP	Se logró nueva formación de vasos sanguíneos, de piel y de estructuras nerviosas en tres pacientes con anomalías óseas severas al aplicar células madre adultas.
<i>(J. Lee et al., 2010)</i>	Reconstrucción mandibular	BM- MSC	Injerto óseo autólogo	Reparación de un segmento óseo largo (15 cm) Inyección de MSCs en una matriz de fibrina en el sitio del defecto Utilización de hueso autólogo Nueva formación de tejido óseo después de cuatro meses

Los estudios clínicos realizados hasta ahora han demostrado que es seguro utilizar las MSCs en procedimientos de injertos óseos. Ninguno de los informes menciona efectos adversos tales como inflamación o el crecimiento excesivo de los tejidos. Para la mayoría de los reportes, una fase de expansión de 6 a 8 semanas proporciona un número suficiente de células. Los datos clínicos presentados sugieren que es probable que las MSCs injertadas contribuyan a la regeneración ósea, sin embargo, la falta de controles adecuados, difíciles de implementar en ensayos en humanos no permite sacar conclusiones contundentes. Por esto, se hace necesario realizar mayor cantidad de investigaciones clínicas para estudiar el comportamiento biológico de las MSCs dentro de la medicina regenerativa.

La evidencia científica soporta el uso de las MSCs como una poderosa herramienta de la terapia celular para diversas aplicaciones clínicas por su potencial regenerativo y sus propiedades biológicas. En este estudio logramos crear un modelo para la aplicación clínica de las MSCs desarrollando un sistema de cultivo celular tridimensional que mejora el proceso de regeneración tisular y que podría llegar a ser una exitosa estrategia en búsqueda de una nueva alternativa para optimizar el tratamiento de ciertas patologías óseas.

Capítulo 2

Justificación y Objetivos

2.1. Justificación

Las lesiones en el tejido óseo causadas por trauma, tumores, infecciones, osteonecrosis, enfermedades congénitas y degenerativas, representan uno de los mayores problemas clínicos en cirugía de cabeza y cuello.

Una de las patologías congénitas maxilofaciales más frecuentes es el labio y paladar hendido; la incidencia a nivel mundial de hendiduras orofaciales es aproximadamente de uno de cada 700 nacidos vivos (Kramer, Baethge, Sinikovic, & Schliephake, 2007; Mladina et al., 2008) la cual varía según las características étnicas, geográficas y la naturaleza en si de la hendidura. La incidencia de labio y/o paladar hendido es aproximadamente de 1 en 1000 nacidos vivos en Estados Unidos , 1 en 500 nacidos vivos en Europa (Magdalenic-Mestrovic & Bagatin, 2005) y en Colombia se ha informado una prevalencia de 1 por cada 1000 nacidos vivos (Duque, Estupiñan, & P., 2002).

El trauma maxilofacial representa otro problema de salud importante en nuestro país, donde se afectan principalmente los tejidos blandos, los tejidos duros del tercio superior, medio e inferior de la cara y las estructuras dentoalveolares. En Colombia más de 700.000 pacientes acuden cada año a los servicios de urgencias por trauma maxilofacial derivado principalmente de accidentes de tránsito y violencia (Kloss et al., 2007; Pauwels A.).

La incidencia del cáncer de cabeza y cuello se ha incrementado significativamente en los últimos 20 años. Se considera que 500.000 nuevos casos de cáncer de cabeza y cuello ocurren anualmente en el mundo. En estados unidos el 5% de la población masculina y el 2% de la femenina están afectados por cáncer oral y cerca de 25.000 nuevos casos de cáncer oral y maxilofacial son registrados anualmente (Lung, Tascau, Almasan, & Muresan, 2007).

De acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, en 2002 se presentaron en Colombia alrededor de 70.750 casos nuevos de cáncer; para ese mismo año se registraron 42.050 muertes por esta causa (Rodríguez, 2007).

La enfermedad periodontal es una de las entidades más comunes a nivel mundial y una de las principales causas de pérdida dentaria y perdida ósea alveolar. La Tercera En-

cuesta de Salud Bucal (ENSAB III) que se hizo en Colombia, reportó para todas las formas de enfermedad periodontal (gingivitis y periodontitis) una prevalencia de 50.2% de la población; de esta cifra 17.7% de los casos corresponden a periodontitis de moderada a severa (Salud, 2000).

La terapéutica actual para la reconstrucción de defectos óseos que se presentan como resultado de lesiones traumáticas, neoplásicas y malformaciones congénitas, incluye el trasplante de injertos óseos, implantes de diferentes biomateriales o métodos de transporte óseo, que no proveen un resultado totalmente satisfactorio.

El uso de injertos óseos en la práctica clínica presenta varios inconvenientes, como la posibilidad de complicaciones trans y postoperatorias del sitio donador, aumentando la morbilidad en el paciente, pérdida del injerto por no unión, reabsorción osteoclástica, microfracturas o infección bacteriana o viral.

Para reducir esta problemática, la ingeniería de tejidos se ha desarrollado como una estrategia para la regeneración de tejido óseo, utilizando los elementos clave para la reparación ósea: una matriz osteoconductiva, factores de crecimiento para la osteoinducción y vascularización del nuevo hueso y/o implante de células con potencial osteogénico, en un ambiente físico-químico apropiado que permita la regeneración ósea.

Es por esto que este estudio plantea la necesidad de la utilización de la ingeniería tisular como una herramienta terapéutica de gran impacto en el sistema general de salud de nuestro país. Desarrollando un modelo económico, biocompatible y efectivo que podría llegar a ser una exitosa estrategia en la búsqueda de una nueva alternativa para la administración y aplicación clínica de la terapéutica celular con células madre mesenquimales en la medicina regenerativa.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de células madre mesenquimales humanas obtenidas a partir de tejido adiposo (Ad-MSCs) embebidas en un hidrogel de plasma sanguíneo, de reparar lesiones óseas en un modelo in vivo, en mandíbulas de conejo.

2.2.2. Objetivos Específicos

- Estandarizar las condiciones de cultivo de las células madre mesenquimales humanas obtenidas a partir de tejido adiposo (Ad-MSCs), embebidas en hidrogeles de plasma sanguíneo.
- Evaluar la proliferación y capacidad de diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales humanas obtenidas a partir de tejido adiposo (Ad-MSCs), embebidas en hidrogeles de plasma sanguíneo.
- Desarrollar un modelo in vivo para el implante de células madre mesenquimales humanas obtenidas a partir de tejido adiposo (Ad-MSCs), embebidas en hidrogeles de plasma sanguíneo.
- Evaluar el proceso de reparación ósea de las lesiones creadas en mandíbulas de conejo, después de la implantación de células madre mesenquimales humanas obtenidas a partir de tejido adiposo (Ad-MSCs), embebidas en un hidrogel de plasma sanguíneo.

Capítulo 3

Diseño Metodológico

En este capítulo se expondrá la metodología utilizada en el estudio. En términos generales, este trabajo de investigación se dividió en dos fases: una fase *in vitro* y una fase *in vivo*. Durante la fase *in vitro* caracterizamos y expandimos Ad-MSCs en monocapa para posteriormente cultivarlas en el interior de un hidrogel de plasma sanguíneo humano, para a continuación en la fase *in vivo*, implantar estos constructos en defectos óseos creados quirúrgicamente mandíbulas de conejos.

3.1. Fase in Vitro

La **Figura 3.1** y **Figura 3.2** presentan el diagrama de flujo del diseño metodológico de la fase *in vitro* de la investigación, que corresponde a la expansión y cultivo de las MSCs en monocapa y en hidrogel de plasma sanguíneo humano, respectivamente.

3.1.1. Obtención y procesamiento de la muestra de tejido adiposo humano

Las muestras para el estudio se obtuvieron a partir de dos individuos mayores de edad programados para cirugía maxilofacial, con previa aprobación y firma de consentimiento informado (Anexo 1). Las muestras de tejido adiposo fueron procesadas con los criterios previamente estandarizados por nuestro grupo de investigación “Biología de células madre” (Beltran, 2007). El tejido adiposo humano fue cortado con bisturí estéril hasta obtener fragmentos de aproximadamente 0.2 a 0.5 cm de diámetro, los cuales fueron lavados con PBS, hasta eliminar completamente los rastros de sangre. Los explantes de tejido adiposo así preparados fueron sembrados en cajas plásticas de cultivo de 6 pozos (cajas Greiner Bio-one), con medio de cultivo Dulbecco’s Modified Eagle medium low glucose (DMEM marca GIBCO™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB marca GIBCO™), penicilina 100U/ml, estreptomicina 100µg/ml e incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El medio fue

reemplazado por medio de cultivo fresco dos veces por semana, hasta que las células alcanzaron el 70-80% de confluencia entre la segunda y la tercera semana de cultivo. El explante de tejido adiposo fue retirado en la segunda semana de cultivo.

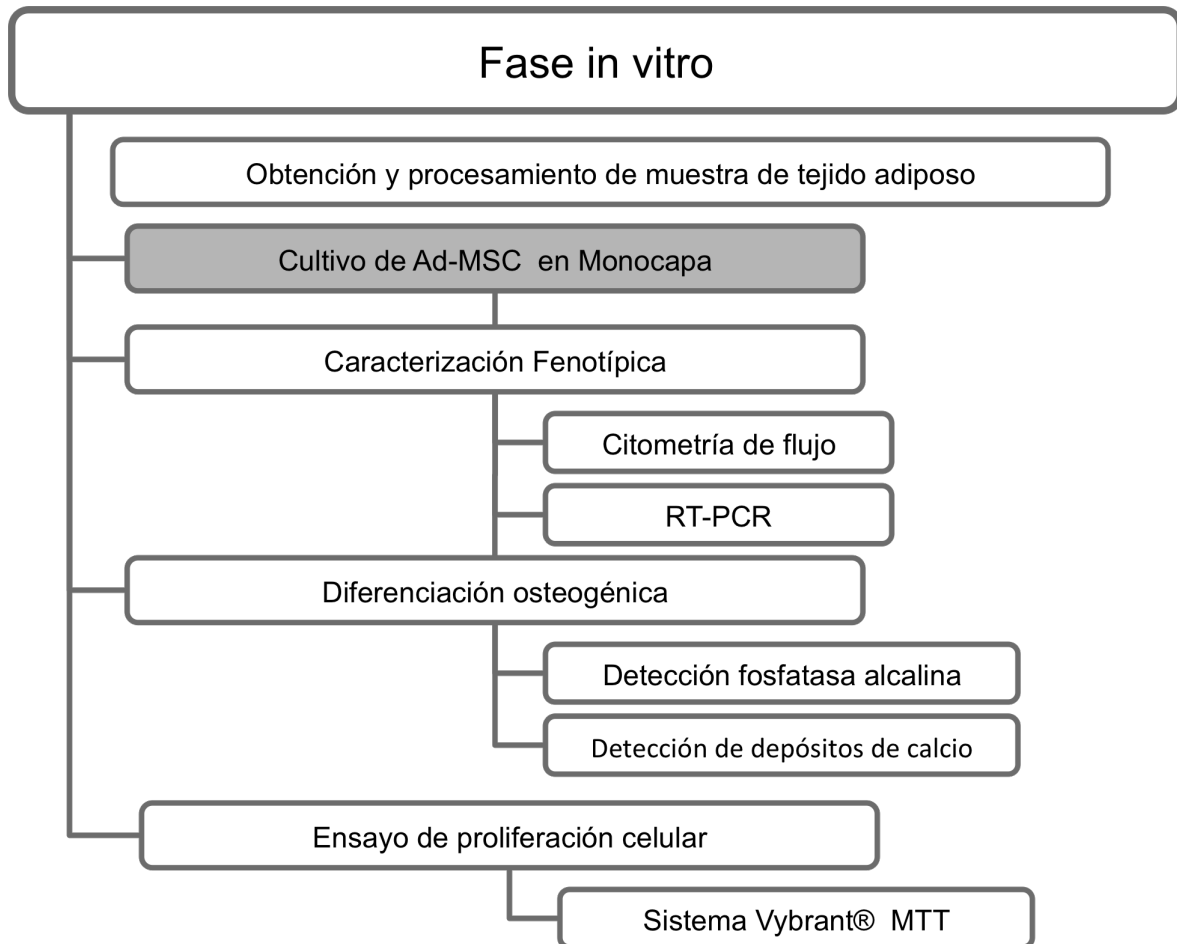


Figura 3.1. Diagrama de flujo del diseño metodológico de la fase in vitro. Aislamiento, cultivo y caracterización de las Ad-MSCs humanas

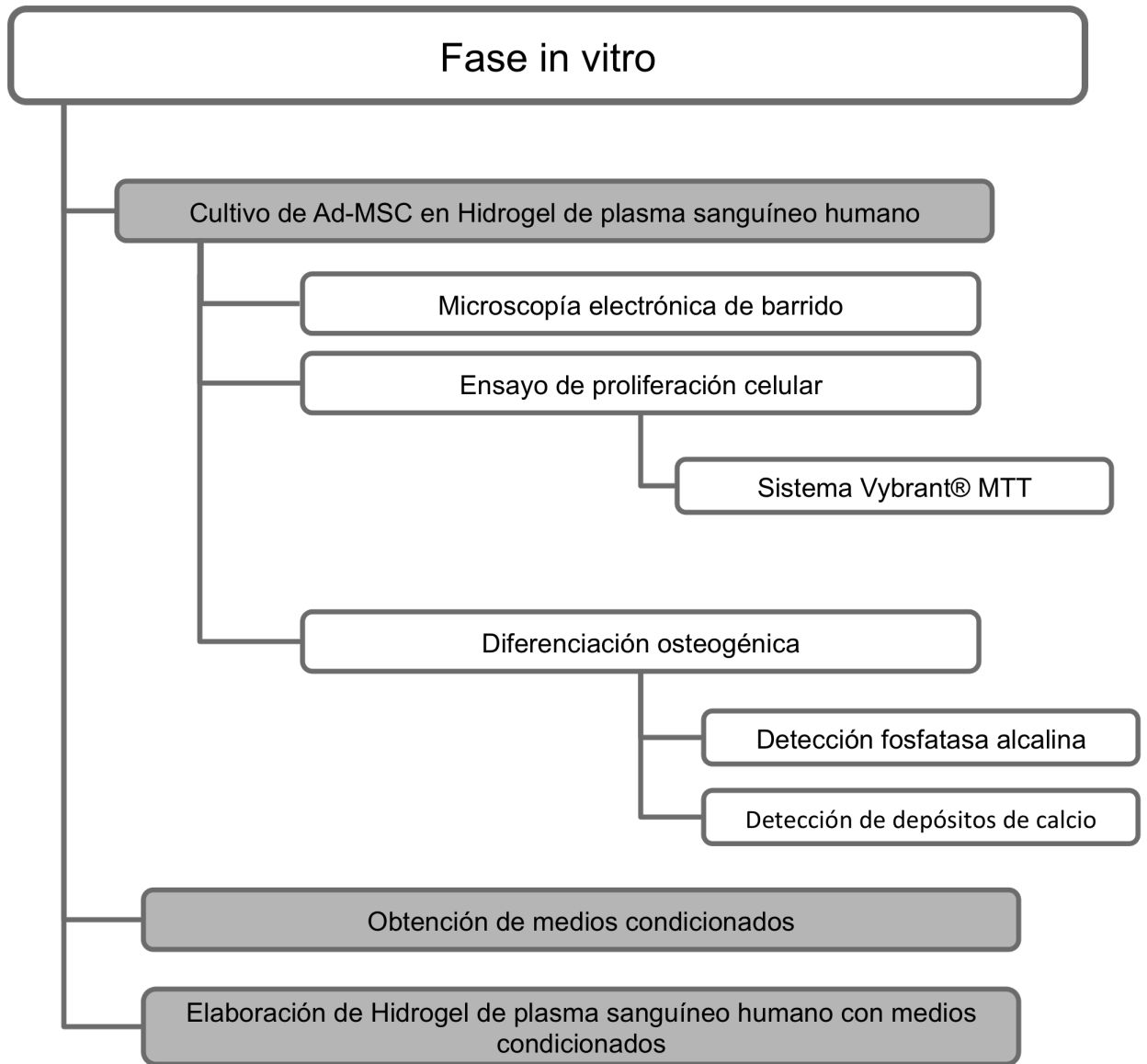


Figura 3.2. Diagrama de flujo del diseño metodológico de la fase in vitro. Cultivo de las Ad-MSCs en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. Elaboración de Hidrogeles con medios condicionados

3.1.2. Cultivo de las Células Madre Mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (Ad-MSC) en monocapa

Las células obtenidas, fueron cultivadas en frascos de cultivo T-25, con medio Dulbecco's Modified Eagle medium low glucose (DMEM marca GIBCO™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB marca GIBCO™), penicilina 100U/ml, estreptomina 100µg/ml e incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El medio fue reemplazado por medio de cultivo fresco dos veces por semana, hasta que las células

alcanzaron el 70-80% de confluencia. Se realizaron pasajes (1-6) de los cultivos celulares con tripsina 0,25% (GIBCO™).

3.1.3. Caracterización Fenotípica de las Ad-MSC

Con el fin de determinar la naturaleza de las células madre mesenquimales según los criterios de la sociedad internacional de terapia celular, se analizaron tres parámetros: 1. Morfología y adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar. 2. Caracterización del fenotipo celular, según la presencia y ausencia de marcadores de superficie celular específicos y 3. Potencial de diferenciación in vitro hacia linajes osteogénico y adipogénico. (Isaacson & Herman, 1996; Meirelles Lda et al., 2009; Salem & Thiernemann, 2010)

3.1.3.1. Caracterización por transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se aisló el RNA total de los cultivos de las células adherentes derivadas de tejido adiposo, con morfología fibroblastoide, por el método de Chomczynski & Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 2006), utilizando el reactivo TRizol (Sigma-Aldrich) según las recomendaciones del fabricante. La presencia de RNA intacto fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en todas las muestras procesadas. Luego, se realizó una transcripción reversa con primer oligo (dT) (Integrated DNA Technologies) y la enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™). La reacción se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante Invitrogen™.

La reacción de PCR se realizó a un volumen final de 50 µl con 1.25 unidades de Go Taq DNA Polimerasa recombinante (Promega), deoxinucleótidos trifosfato a 0,1 mM (dNTPs), cDNA y pares de primers específicos. Las condiciones de PCR estandarizadas fueron las siguientes: 94°C por 5 minutos seguidos de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 50°C por 50 segundos y 72°C por 60 segundos, realizados en el termociclador Cycler Biorad del Laboratorio de Equipos Comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Se analizó la expresión de los marcadores de superficie CD105, CD73, CD166, CD44 (Característicos del linaje mesenquimal) y el marcador CD34 (marcador característico del linaje hematopoyético, como control negativo). Como control de la reacción se analizó la expresión del gen constitutivo de la enzima Gliceraldehido 6-fosfato deshidrogenasa (GADPH).

Para visualizar los productos amplificados se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio.

Para evaluar la expresión de marcadores CD105, CD73, CD166, CD44, CD34 y el gen GADPH se utilizaron secuencias de primers que se presentan en la **Tabla 3.1**:

Tabla 3.1. Lista de primers utilizados para la caracterización de las Ad-MSC por RT-PCR

Gen	PRIMER SENTIDO 5' → 3' PRIMER ANTISENTIDO 5' → 3'	PRODUCTO (pb)
CD105	5'- TGTCTCACTTCATGCCTCAGCT -3' 5'- AGGCTGTCCCTGTTGAGGAGT -3'	377
CD73	5'- ATTGCAAAGTGGTTCAAAGTCA -3' 5'- ACACTTGGCCAGTAAAATAGGG	124
CD166	5'- AGATACCATTATCATCATACCTTGACT-3' 5'- TGTCTTTGTATTTCGTGTACATCGTCG -3'	157
CD44	5'- GACACATATTGCTTCAATGCTTCAGC -3' 5'- GATGCCAAGATGATCAGCCATTCTGGAA -3'	482
CD34	5'- GAATAGCTCTGGTGGCTTGC -3' 5'- CTCTTCTGTCCAGTCACAGAC -3'	440
GAPDH	5'- GTCTTCTCCACCATGGAGAAGGCT-3' 5'- CATCGCCAGTGAGCTTCCCGTTCA-3'	395

3.1.3.2. Caracterización por citometría de flujo

Se utilizaron Ad-MSC de sexto pasaje para realizar los análisis de citometría de flujo. Las células cultivadas, en un 70% de confluencia fueron recolectadas con Tripsina al 0,25% (GIBCO™). Se llevaron a una concentración de 5×10^5 células resuspendidas en 500 μ l de PBS y marcadas con 10 μ l de los siguientes anticuerpos:

- CD 105 monoclonal antihumano. PE (Phycoerytrin, clon sn6. eBioscience)
- CD 34 monoclonal antihumano. APC (Allophicocyanin, clon AC 136, Miltenyi Biotec)
- CD 45 monoclonal antihumano. RPE-Cy5 (R-phycoerytrin-Cyanine 5, clon T29/33, Dako Cytomation)
- CD 90 monoclonal antihumano. APC (Allophicocyanin. Alexa Fluor, clon F 15-42-1, AbD, Serotec)
- HLA-ABC monoclonal antihumano. FITC (Fluorescein Isothiocyanate, clon w6/332, AbD, Serotec)
- HLA-DR monoclonal antihumano. RPE (R-Phycoerytrin, clon AB/3, Dako Cytomation).

Como controles negativos específicos de isotipo se utilizaron IgG1/RPE Cy5, IgG2a/RPE y IgG1/FITC.

Después de la marcación los tubos se llevaron a incubación durante 30 minutos en oscuridad y finalizado este tiempo se realizaron las lecturas de las muestras.

Las lecturas y el análisis de resultados se realizaron con el citómetro FACSCanto ubicado en la Unidad de Citometría de Flujo del Departamento de Farmacia (UCFDF) de la Universidad Nacional de Colombia.

Se adquirieron aproximadamente 10.000 eventos de la región que corresponde a una población celular con alta complejidad (side scatter) y tamaño (forward scatter) y se realizó el análisis seleccionado de esta población para observar la expresión de antígenos CD34, CD45, CD105, CD90, HLA-ABC, HLA-DR independientemente.

3.1.4. Diferenciación Osteogénica

Los cultivos celulares entre pasajes 4 al 6 con un 70% de confluencia fueron incubados en medio de diferenciación osteogénico: DMEM suplementado con 10% de SFB, penicilina 100U/ml, estreptomycin 100µg/ml, dexametasona 0.1 µM, ascorbato-2-fosfato 50µM y β-glicerol fosfato 10 mM (Sigma-Aldrich) (R. H. Lee et al., 2004; Zuk et al., 2002). El medio de inducción fue reemplazado 2 veces por semana, durante tres semanas incubando las células a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Como control negativo se usaron células incubadas en medio de cultivo convencional y todos los ensayos se realizaron por triplicado.

A la primera semana de inducción se evaluó la presencia de la enzima fosfatasa alcalina, un marcador temprano de diferenciación osteogénica, mediante la tinción de Fast Red TR (Sigma-Aldrich). Adicionalmente, a las 3 semanas de incubación con el medio de inducción, las células fueron teñidas para detectar depósitos de calcio utilizando las tinciones de Von Kossa y Alizarin Red S (Sigma-Aldrich).

3.1.4.1. Fosfatasa Alcalina: Coloración Fast Red TR

A las células en cultivo suplementado con medio de inducción se les eliminó el medio de cultivo y se lavaron con PBS. Posteriormente se fijaron las células aplicando 200µl de formaldehído 10% en PBS durante 15 minutos. Se agregaron 500µl de la solución C (Tabla 3.2) durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavó con PBS y se adicionó el colorante de contraste (hematoxilina), se lavó inmediatamente y se observó al microscopio (Lowe, 1998).

3.1.4.2. Coloración de Von Kossa

Después de la tercera semana de cultivo se lavaron las células con PBS y se fijaron en formaldehído al 10% durante 20 minutos. Se lavaron nuevamente con PBS y se agregó solución de nitrato de plata 2% (Sigma-Aldrich) durante 10 a 15 minutos incubando en oscuridad. Después de tres lavados con PBS, se expusieron a la luz brillante durante 5-20 minutos. Se observó al microscopio.

Tabla 3.2. Soluciones para la coloración de fosfatasa alcalina

<p>A. 0.2M Tris HCL buffer pH 8.3</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0.2M Tris (2.42g/100) 25ml • 0.1N HCL (0.85/110ml) 20ml • Agua destilada 75ml
<p>B. Naphthol ASBI stock</p> <ul style="list-style-type: none"> • Naphthol ASBI fosfato 25mg • N:N Dimetil formamida 10ml • Agua destilada 10ml • Ajustar a pH 8.0 con 1M con carbonato de sodio si es necesario, agregar agua • Agregar 0.2M Tris HCL buffer pH 8.3 (solucion A) 180ml
<p>C. Solución de trabajo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Naphthol ASBI stock 10 ml • Fast red TR 10 mg • Filtrar y usar inmediatamente

3.1.4.3. Coloración de Alizarin Red S

Después de la tercera semana de cultivo se lavaron las células con PBS y se fijaron en formaldehído al 4% durante 10 minutos. Se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron en una solución de Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) al 1% durante 10 minutos (R. H. Lee et al., 2004). Se observó al microscopio.

En cada caso se utilizaron como controles negativos células incubadas en medio convencional. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las células fueron fotografiadas utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 y una cámara Nikon Digital Sight DS-Mv.

3.1.5. Ensayo de proliferación de las Ad- MSC en monocapa

Para el análisis de proliferación se utilizó Vybrant® MTT Cell proliferation assay kit (Invitrogen™ V-13154). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT (Bromuro 3(4,5-dimetiltiazol 2 -ilo)-2,5 difeniltetrazol) en un compuesto llamado Formazán (azul), permitiendo así determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Luego de la solubilización del Formazán se determina su concentración por densidad óptica a 530 – 570 nm según las indicaciones del fabricante, siendo la cantidad de células vivas proporcionales a la cantidad de Formazán producido.

Las MSCs se sembraron en caja de 96 pozos a una concentración de 9500 células en 100µl de DMEM suplementado con 10% SFB, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100µg/ml e incubados a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂ durante 12 horas

hasta su adherencia, y se realizaron lecturas entre los días 1 y 12. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos fueron comparados con la curva estándar con concentraciones celulares conocidas.

3.1.6. Cultivo de las Célula Madre Mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (Ad-MSC) en hidrogeles de plasma sanguíneo humano

Se elaboró una matriz tridimensional con los siguientes componentes: Plasma sanguíneo humano (33,2%), solución salina estéril (53,32%), ácido tranexámico (0,64%), suspensión de Ad-MSCs (6to pasaje) en DMEM 10 % de SFB (6,64%) y CaCl₂ estéril (6,64%).

Cada hidrogel tiene un volumen de 250µl y una concentración de 50.000 células por hidrogel. Las células fueron cultivadas con medio Dulbecco's Modified Eagle's medium low glucose (DMEM marca GIBCO™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB marca GIBCO™), penicilina 100U/ml - estreptomicina 100µg/ml e incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

3.1.6.1. Microscopía electrónica de barrido de Ad-MSC en hidrogeles de plasma sanguíneo humano.

La microscopía electrónica de barrido fue utilizada para determinar la morfología y porosidad de la matriz tridimensional de plasma sanguíneo humano. Como parte del proceso de preparación de la muestra para microscopía electrónica de barrido se utilizó el método de secado de punto crítico para secar el tejido sin que este se deforme conservando su estructura original. Las muestras de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC anteriormente descritas, se fijaron en glutaraldehído al 2%, se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol y se secaron utilizando el secador de punto crítico, para retener la estructura del poro. Posteriormente las muestras fueron recubiertas con Au/Pd y se procedió a analizarlas al microscopio electrónico de barrido en el laboratorio de microscopía electrónica de barrido, en el Centro de Equipos Interfacultades – CEIF de la Universidad Nacional de Colombia (Linnes et al., 2007).

3.1.7. Proliferación celular de las Ad-MSC en hidrogeles de plasma sanguíneo humano

3.1.7.1. Ensayo de proliferación con el sistema Hoechst

Antes de hacer el hidrogel de plasma sanguíneo, las células fueron marcadas con el sistema Hoeschst Stains (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Para esto, las células se incubaron con la solución de Hoechst + DMEM (1:10) por 10 minutos a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ y luego se centrifugaron por 10 minutos a 1200 rpm. Después de retirar el sobrenadante de la solución de Hoechst + DMEM, se realizaron lava-

dos con PBS y el pellet celular se resuspendió en medio DMEM fresco suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina 100 U/ml - estreptomycin 100µg/ml. Posteriormente, se elaboró el hidrogel de plasma sanguíneo de manera convencional.

La concentración celular de cada hidrogel es de 50.000 células por pozo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El conteo celular se ejecutó de forma manual en el microscopio confocal N1-Plus Marca NIKON del Laboratorio de Equipos Comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

3.1.7.2. Evaluación de la proliferación celular con el sistema DAPI

Antes de hacer el hidrogel de plasma sanguíneo, las células fueron marcadas con el sistema DAPI Nucleic Acid Stain (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Para esto, las células se incubaron con la solución DAPI + DMEM por 10 minutos a 37°C en atmosfera húmeda al 5% de CO₂ y luego se centrifugaron por 10 minutos a 1200 rpm. Después de retirar el sobrenadante de la solución de DAPI + DMEM, se realizaron lavados con PBS y el pellet celular se resuspendió en medio DMEM fresco suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina 100U/ml - estreptomycin 100µg/ml. Posteriormente, se realizó el hidrogel de plasma sanguíneo de manera convencional.

La concentración celular de cada hidrogel es de 50.000 células por pozo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El conteo celular se realizó de forma manual en el microscopio confocal N1-Plus Marca NIKON de el laboratorio de equipos comunes de la Universidad Nacional de Colombia.

3.1.7.3. Ensayo de proliferación con el sistema Vybrant CFDA

Antes de hacer el hidrogel de plasma sanguíneo, las células fueron marcadas con el sistema Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Para esto, las células se incubaron con la solución 10µM de CFDA SE por 15 minutos a 37°C en atmosfera húmeda al 5% de CO₂ y luego se centrifugaron por 10 minutos a 1200 rpm. Después de retirar el sobrenadante de la solución de CFDA SE, el pellet celular se resuspendió en medio DMEM fresco suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina 100U/ml- estreptomycin 100µg/ml. Posteriormente, se elaboró el hidrogel de plasma sanguíneo de manera convencional.

La concentración celular de cada hidrogel es de 50.000 células por pozo haciendo seguimiento hasta el día 18. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El conteo celular se ejecutó de forma manual en el microscopio confocal N1-Plus Marca NIKON del Laboratorio de Equipos Comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

3.1.7.4. Ensayo de proliferación con el sistema Vybrant® MTT

Se elaboraron los hidrogeles con una concentración celular de 47.662 células por pozo haciendo seguimiento hasta el día 16 y se comparó con una curva de calibración en hidrogeles de plasma sanguíneo con diferentes concentraciones celulares ya conocidas

(15.000 a 200.000 células por pozo). Para evaluar la viabilidad y proliferación celular en los constructos plasma sanguíneo – Ad-MSCs se utilizó el ensayo Vybrant® MTT Cell proliferation assay kit (Invitrogen™ V-13154), el cual mide la formación de cristales de Formazán permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células vivas. Se logro la disolución de los cristales de Formazán con Isopropanol durante 15 minutos en ultrasonido y centrifugación a 40.000 rpm por 3 minutos. Se tomó el sobrenadante para lectura inmediata en el microlector de platos Ultramark a una longitud de onda de 570 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.1.8. Diferenciación osteogénica de Ad-MSC en hidrogeles de plasma sanguíneo humano

Las Ad-MSC embebidas en los hidrogeles de plasma sanguíneo humano fueron incubadas en medio de diferenciación osteogénica: DMEM suplementado con 10% de SFB, penicilina 100U/ml, estreptomycin 100µg/ml, dexametasona 0.1µM, ascorbato-2-fosfato 50µM y β-glicerol fosfato 10 mM (Sigma-Aldrich) (R. H. Lee et al., 2004; Zuk et al., 2002). El medio de inducción fue reemplazado 2 veces por semana, durante tres semanas. Incubando las células a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Después de la primera y tercera semana de inducción osteogénica, se tomaron los hidrogeles, se embebieron en parafina para realizar cortes histológicos y posteriormente la detección de fosfatasa alcalina y de calcio extracelular.

3.1.8.1. Coloración de Fast Red

Después de desparafinizar e hidratar los cortes histológicos, se colocaron durante 30 minutos en la solución de Fast Red elaborada anteriormente para la detección de fosfata alcalina en el cultivo celular en monocapa. Luego, permanecieron en hematoxilina durante 15 minutos y se observaron al microscopio (Lowe, 1998).

3.1.8.2. Coloración de Von Kossa

Después de desparafinizar e hidratar los cortes histológicos, se colocaron en una solución de nitrato de plata al 5% durante una hora. Se realizaron múltiples lavados en agitación con agua destilada y se colocaron en líquido revelador de fotografía por 2 minutos. Se observó al microscopio (Prophet Edna B, 1992).

3.1.9. Obtención de medios condicionados

En estudios previos de nuestro grupo de investigación se estandarizó la obtención de medios condicionados a partir de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y médula ósea humana (Beltran, 2007; Beltran O, 2009; Restrepo, 2009b). Las MSCs provenientes de tejido adiposo son mantenidas hasta pasaje 8 en frascos T de 25ml con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle medium low glucose (DMEM marca GIBCO™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB marca GIBCO™), penicilina 100U/ml, estreptomycin 100µg/ml e incubadas a 37°C en

atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Cuando las células alcanzan 80% de confluencia, se retira el medio DMEM bajo en glucosa, se lavan tres veces con PBS y se adicionan 3ml de medio libre de suero fetal bovino (Opti-MEM® marca GIBCO™) con penicilina 100U/ml, estreptomycin 100µg/ml. Las células se incuban en medio Opti-MEM® libre de suero por 24 horas, en una incubadora con O₂/CO₂ que regula la tensión de oxígeno de su interior sustituyendo aire por N₂. La incubadora es programada para mantener una tensión de oxígeno en su interior del 2%. Las condiciones de CO₂, humedad y temperatura son las utilizadas de manera habitual en cultivos celulares. Los medios condicionados obtenidos se filtran por 0,22µm y se almacenan a -20°C.

3.1.10. Elaboración de hidrogeles de plasma sanguíneo humano

Se elaboró una matriz tridimensional con los siguientes componentes: Plasma sanguíneo humano (33,2%), solución salina estéril (53,32%), ácido tranexámico (0,64%), DMEM 10 % de SFB (6,64%) y CaCl₂ estéril (6,64%). Cada hidrogel tiene un volumen de 600µl.

3.1.11. Elaboración de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad- MSC

Se elaboró la matriz tridimensional de plasma sanguíneo humano con las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de sexto pasaje utilizadas en la fase in vitro. Como se describió anteriormente los componentes del hidrogel fueron: Plasma sanguíneo humano (33,2%), solución salina estéril (53,32%), ácido tranexámico (0,64%), suspensión de Ad-MSCs (6to pasaje) en DMEM 10 % de SFB (6,64%) y CaCl₂ estéril (6,64%).

Cada hidrogel tiene un volumen de 600µl y una concentración de 60.000 células por hidrogel. Las células fueron cultivadas con medio Dulbecco's Modified Eagle's medium low glucose (DMEM marca GIBCO™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB marca GIBCO™), penicilina 100U/ml, estreptomycin 100µg/ml e incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24 horas.

3.1.12. Elaboración de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con medios condicionados

Se elaboró la matriz tridimensional de plasma sanguíneo humano con medios condicionados obtenidos a partir de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en condiciones de hipoxia. Los componentes del hidrogel fueron : Plasma sanguíneo humano (33,2%), solución salina estéril (53,32%), ácido tranexámico (0,64%), medios condicionados (6,64%) y CaCl₂ estéril (6,64%). Cada hidrogel tiene un volumen de 600µl.

3.2. Fase in vivo

En la **Figura 3.3** se presenta el diagrama de flujo del diseño metodológico de la fase in vivo de la investigación, en la cual se evaluó en un modelo animal la regeneración ósea de defectos mandibulares creados quirúrgicamente.

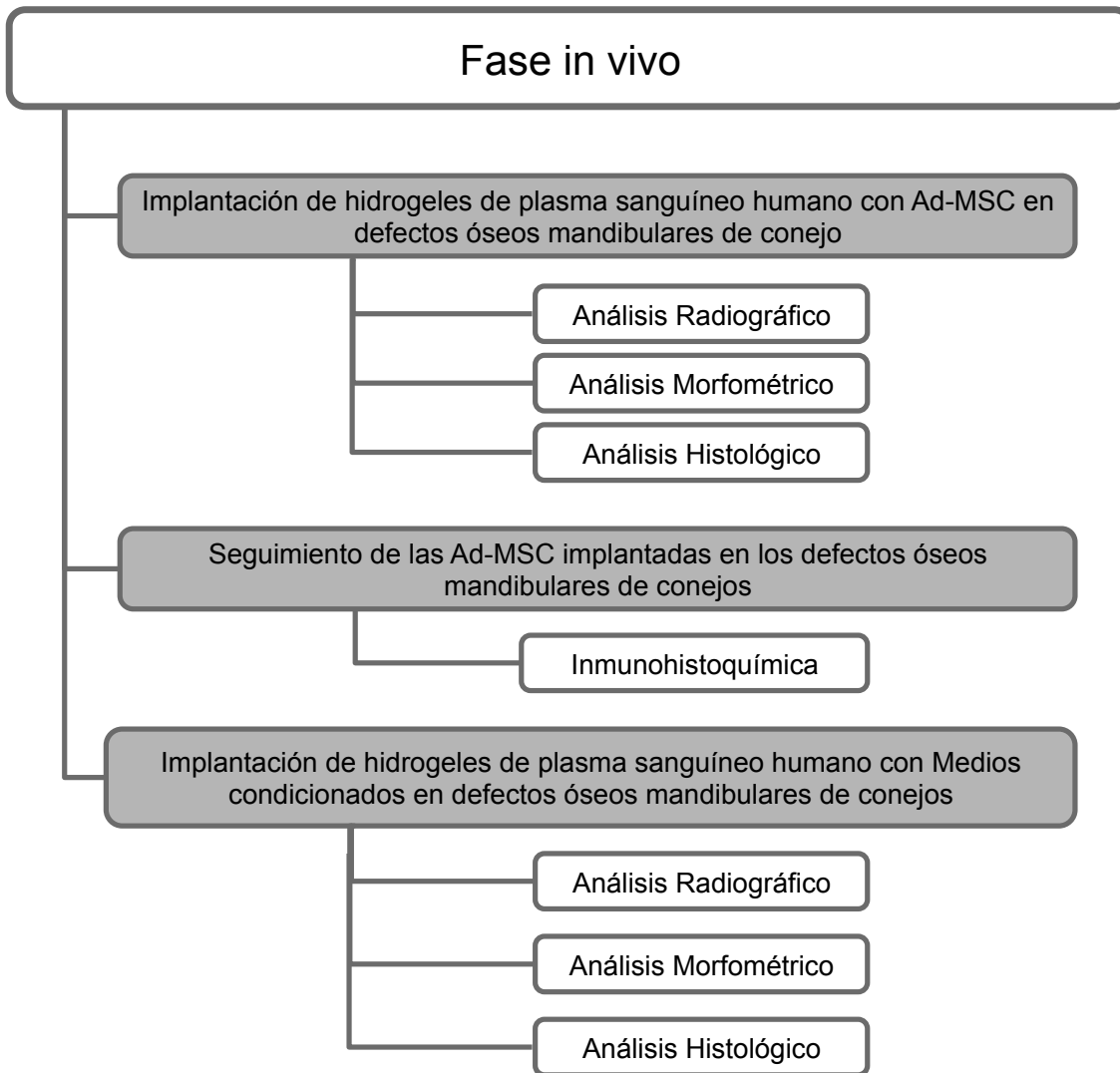


Figura 3.3. Diagrama de flujo del diseño metodológico de la fase in vivo. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano elaborados con Ad-MSCs y con medios condicionados

3.2.1. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC en defectos óseos mandibulares de conejos

3.2.1.1. Diseño Metodológico

Se emplearon 18 conejos machos de raza Nueva Zelanda de 3 meses de edad, con un peso aproximado de 2-3 Kg. Este primer grupo fue utilizado para comparar la regeneración tisular de heridas óseas creadas quirúrgicamente en las mandíbulas de los conejos. En el mismo individuo, en el lado tratado se implantaron hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC y en el lado contralateral (control) se les injertó el hidrogel de plasma sanguíneo humano sin células. Después de realizados los tratamientos quirúrgicos se subdividió la población en 4 grupos y los animales fueron sacrificados a los 15, 30, 45 y 60 días respectivamente. Las unidades experimentales fueron heridas óseas bicorticales mandibulares y los niveles de tratamiento fueron el tipo de injerto utilizado: hidrogel de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC e hidrogel de plasma sanguíneo humano sin Ad-MSC. Como control negativo se empleó un conejo en donde se realizó el mismo procedimiento quirúrgico y se implantó en un lado la matriz de plasma sanguíneo humano sin células y en el otro lado se permitió el cierre por segunda intención. Este individuo se sacrificó a los 45 después de operado (Figura 3.4). La manipulación de los animales se llevó a cabo siguiendo los lineamientos internacionales (Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de America (NAP, 1996) y Nacionales (SALUD, 1993).

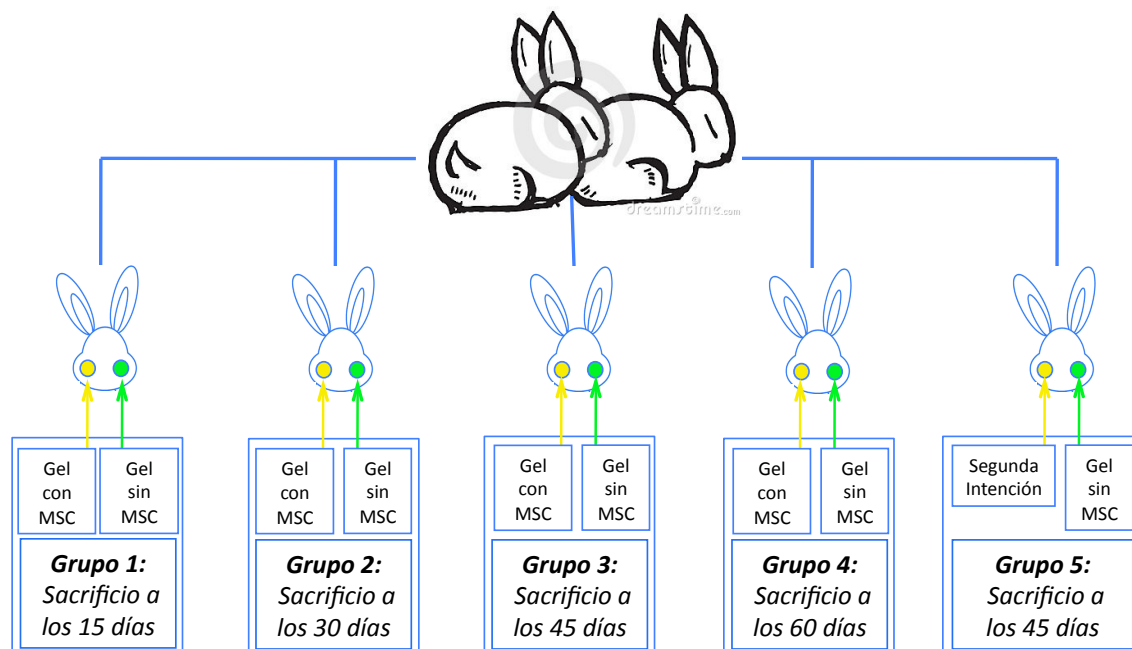


Figura 3.4. Diseño Experimental. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC en defectos óseos mandibulares de conejos. Distribución de unidades experimentales y asignación de tratamientos a cada unidad experimental.

3.2.1.2. Procedimiento quirúrgico

Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia general inhalada y en condiciones estrictas de esterilidad en la Clínica de Pequeños Animales de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia con la colaboración de dos médicos veterinarios. Todos los defectos óseos tenían el mismo tamaño, se manejaron con la misma técnica quirúrgica y fueron realizados por el mismo cirujano máxilofacial.

El protocolo de medicación fue el siguiente: premedicación: Ketamina 20 mg/Kg de peso intravenosa + Xylazina 3 mg/Kg de peso vía intramuscular. Inducción anestésica: Propofol 3mg/Kg de peso vía intravenosa. Mantenimiento: Isoflurano, fluidos intraoperatorios: Solución Salina Fisiológica 7 ml/Kg de peso hora. Anestesia local: Lidocaina al 2% con Epinefrina 1:80.000. Como tratamiento antibiótico se administró Penicilina Benzatinica dosis única de 30.000 UI /Kg de peso vía intramuscular.

Previo asepsia y antisepsia del campo operatorio, se realizó incisión extraoral en el borde inferior mandibular de ambos lados, disección roma, desinserción y elevación subperiostica del músculo masetero (bucal y lingualmente) hasta exponer el ángulo mandibular. Posteriormente, se utilizó un elemento rotatorio (Trefina) para crear un defecto circular bicortical de 10 mm de diámetro en la región anterior de los ángulos mandibulares (Kazakos et al.). Para el modelo experimental en esta especie animal, el tamaño crítico del defecto óseo es de 5 mm de diámetro. Este tamaño ha sido reportado como la herida ósea más pequeña que no cicatriza por segunda intención durante la vida media del animal (Schmitz & Hollinger, 1986). A continuación se implantó en el lado tratado, un hidrogel de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC y en el lado contralateral (lado control) un hidrogel de plasma sanguíneo humano sin células (**Figura 3.5**).

Se realizó el cierre por planos de las heridas quirúrgicas con sutura reabsorbible 3 ceros (Vicryl®, Ethicon, Inc., Johnson & Johnson Company, West Somerville, NJ, USA).

3.2.1.3. Manejo y cuidado postoperatorio de los conejos.

En el periodo postoperatorio se hicieron evaluaciones diarias por parte de médico veterinario del estado de salud de los animales (examen clínico general, cicatrización de heridas extraorales, revisión de condiciones de alojamiento, etc.). Durante los tres primeros días se administró analgesia con Meloxicam (Melocam®, LaFrancol S.A., Cali, Valle del Cauca, Colombia) a dosis de 1,5 mg/Kg vía intramuscular, cada 24 horas. Durante los cinco primeros días posoperatorios el tratamiento antibiótico consistió en Tilosina Tylan® 10 mg/Kg de peso vía intramuscular profunda cada 24 horas y se realizó limpieza de las heridas quirúrgicas con Baxidin®.

Los animales se mantubieron en las instalaciones del Bioterio Central de Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia durante todo el estudio.

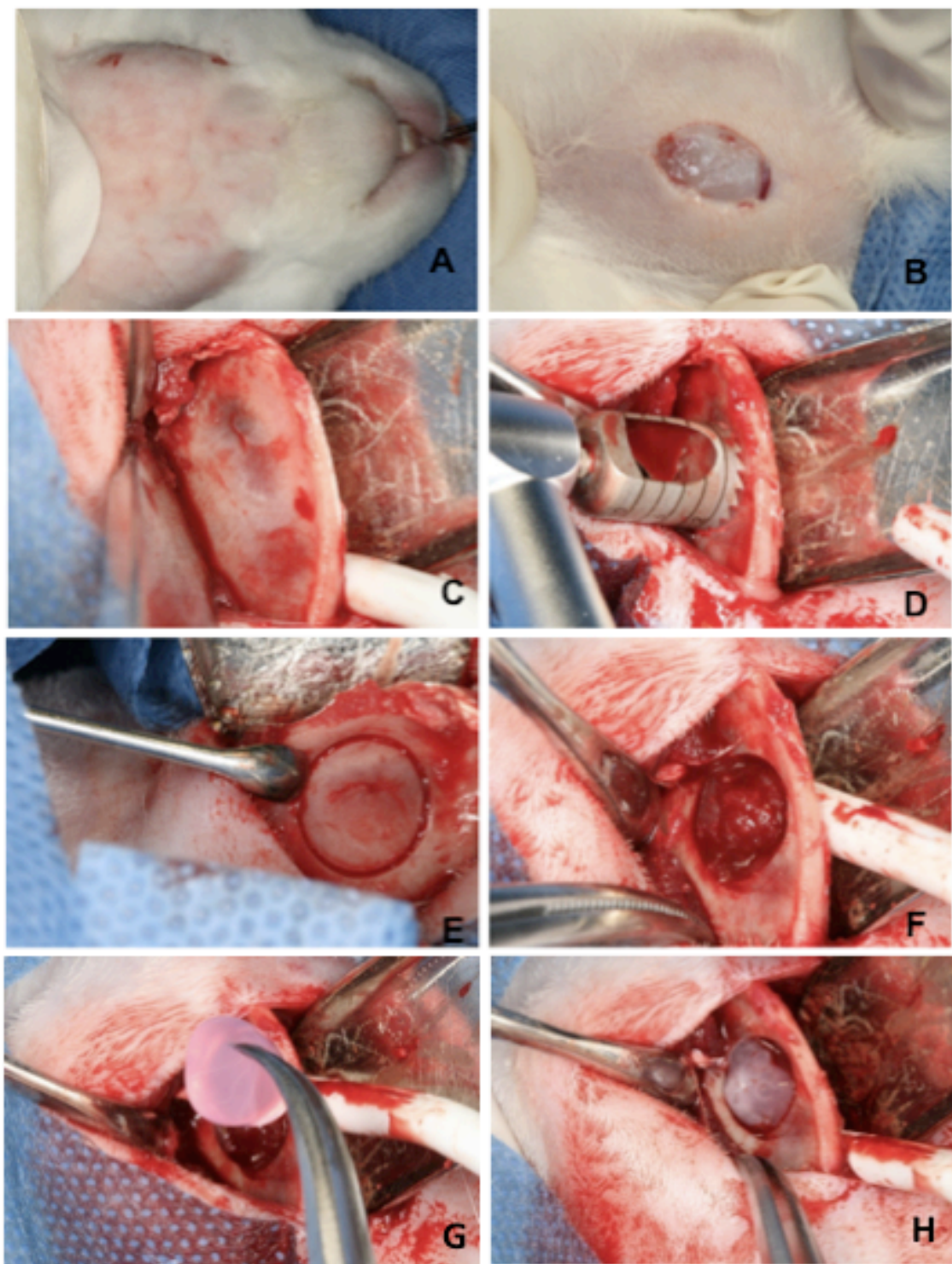


Figura 3.5. Procedimiento quirúrgico. A, preparación de campo operatorio con la exposición de los rebordes mandibulares bilaterales. B, incisión en piel. C, exposición de ángulo mandibular. D, realización de defecto óseo con trefina. E, demarcación de defecto óseo circular. F, defecto óseo mandibular. G, implantación de hidrogel de plasma sanguíneo humano. H, hidrogel de plasma sanguíneo ya posicionado en el sitio de la lesión.

3.2.1.4. Sacrificio de los animales y toma de especímenes quirúrgicos

Los animales tratados fueron sacrificados a los 15, 30, 45 y 60 días mediante inyección intracardiaca de una solución concentrada de anestésicos no inhalantes tipo barbitúricos: Pentobarbital sódico (200 mg/ml) y fenilhidantoína (Eutanex , Aprofarm Ltda., Bogotá D.C., Colombia), a dosis de 1 ml/5 Kg de peso. La eutanasia de estos animales fue realizada por los auxiliares del bioterio central de veterinaria, siguiendo los protocolos descritos en Report of the AVMA Panel on Eutanasia (AVMA, 2007; SALUD, 1993).

3.2.1.5. Análisis radiográfico

Se tomaron radiografías laterales de cráneo de los animales antes y después del procedimiento quirúrgico. Después del sacrificio, se tomaron radiografías periapicales del espécimen mandibular. Las radiografías se realizaron con el equipo de rayos X de la Clínica de Pequeños Animales de la Universidad Nacional de Colombia. Para obtener medidas estandar de los defectos óseos durante el proceso de regeneración, se tomaron las radiografías bajo las mismas condiciones: radiografías laterales de cráneo a 42 Kv a 2.2 mA y las radiografías periapicales a 21 Kv. Las radiografías fueron digitalizadas y sobre esta imagen se evaluó el área y la densidad del nuevo tejido óseo midiendo los siguientes parámetros:

Area total de hueso neoformado: Ya conociendo el área total del defecto óseo inicial (10 mm²), se midió el área total del defecto óseo final para así calcular el área de tejido óseo neoformado con ayuda del programa Image J 1.410 (National Institutes of Health, USA). Para cada tiempo se estableció el porcentaje del tejido óseo neoformado aplicando la Ecuación 3.1.

Ecuación 3.1 Porcentaje del tejido óseo neoformado

$$\text{Tejido óseo neoformado} = (\text{Area defecto óseo inicial} - \text{Area defecto óseo final}) \times 100$$

Densidad ósea relativa: Para la medición de la densidad ósea del nuevo tejido formado en el defecto óseo se utilizó en cada intervalo de tiempo una escala ordinal de cuatro puntos como se expone a continuación en la Tabla 3.3 (Miloro, Haralson, & Desa, 2010).

Tabla 3.3 Escala ordinal para la evaluación de la densidad ósea relativa

1	Sin formación de hueso en el defecto óseo
2	Densidad menor a la del hueso medular adyacente
3	Densidad Mayor o igual a la del hueso medular adyacente , pero menor al hueso cortical
4	Densidad mayor o igual al hueso cortical adyacente

3.2.1.6. Análisis Morfométrico

En los días 15, 30, 45 y 60, después del sacrificio de los animales se tomaron fotografías de los especímenes quirúrgicos y se estimó el porcentaje de tejido óseo neoformado en función del tiempo. Para tal fin, se estableció una relación entre el área del defecto óseo inicial y el área del defecto óseo final con ayuda del programa Image J 1.410 (National Institutes of Health, USA) la cual se expresó como la **Ecuación 3.2**:

Ecuación 3.2 Porcentaje del tejido óseo neoformado

$$\text{Tejido óseo neoformado} = (\text{Area defecto óseo inicial} - \text{Area defecto óseo final}) \times 100$$

Para establecer si las diferencias encontradas eran significativas entre el lado control y el lado tratado con Ad-MS, se realizó el análisis de varianza MLG (Modelo Lineal General) y se utilizó el software estadístico SAS (Statistica Analysis Software) versión 7.2. Fue determinado un nivel de confianza del 95% para establecer diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos de las áreas tratadas y los controles. En todos los casos un $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

3.2.1.7. Procesamiento Histológico

Se tomaron especímenes mandibulares que abarcaban el tamaño del defecto óseo inicial y el tejido duro y blando circundante. Se fijaron en una solución de formol al 10% en PBS, pH 7,4 a 4° C durante 72 horas. Luego, se descalcificaron en Shandon TBD-1® Rapid Descalcifer (Thermo Electron Corporation) durante 24 horas, se deshidrataron en series ascendentes de etanol (70% - 80% - 90% - 100%) y se transfirieron a una solución de xilol al 100% por 30 minutos. Posteriormente, las muestras fueron embebidas en parafina y con ayuda de un micrótopo se obtuvieron cortes histológicos de cuatro micrómetros de espesor que se colocaron en láminas portaobjetos y fueron teñidos con hematoxilina y eosina, tricrómico de masson y azul de toluidina. El procesamiento de las muestras se realizó con el apoyo del Laboratorio de Patología del Instituto Nacional de Salud y de la Universidad Nacional de Colombia.

3.2.1.8. Análisis Histológico

Para realizar las evaluaciones histológicas, se utilizó un microscopio de luz (Nikon ECLIPSE 55i, Nikon, Japón) y se tomaron fotografías con una cámara digital adaptada a éste (Digital sight DS-2Mv, Nikon, Japón), se usó el objetivo de 40X para obtener imágenes panorámicas de los cortes histológicos, 100X para realizar el conteo de células inflamatorias y evaluar el grado de inflamación. Las placas histológicas fueron analizadas llevando a cabo un estudio ciego en el cual participaron patólogos de entidades diferentes.

En las placas histológicas se evaluó el grado de inflamación, en cinco campos consecutivos se realizó el conteo de células inflamatorias y se calculó el valor promedio para categorizar el grado de inflamación.

3.2.2. Seguimiento de las Ad-MSC implantadas en defectos óseos mandibulares de conejos

3.2.2.1. Diseño Metodológico

Se emplearon 4 conejos machos de raza Nueva Zelanda de 3 meses de edad, con un peso aproximado de 2-3 Kg en los que se implantaron hidrogel de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC en defectos óseos mandibulares bilaterales y se sacrificaron a los 3, 6, 9 y 12 días después del tratamiento (Figura 3.6).

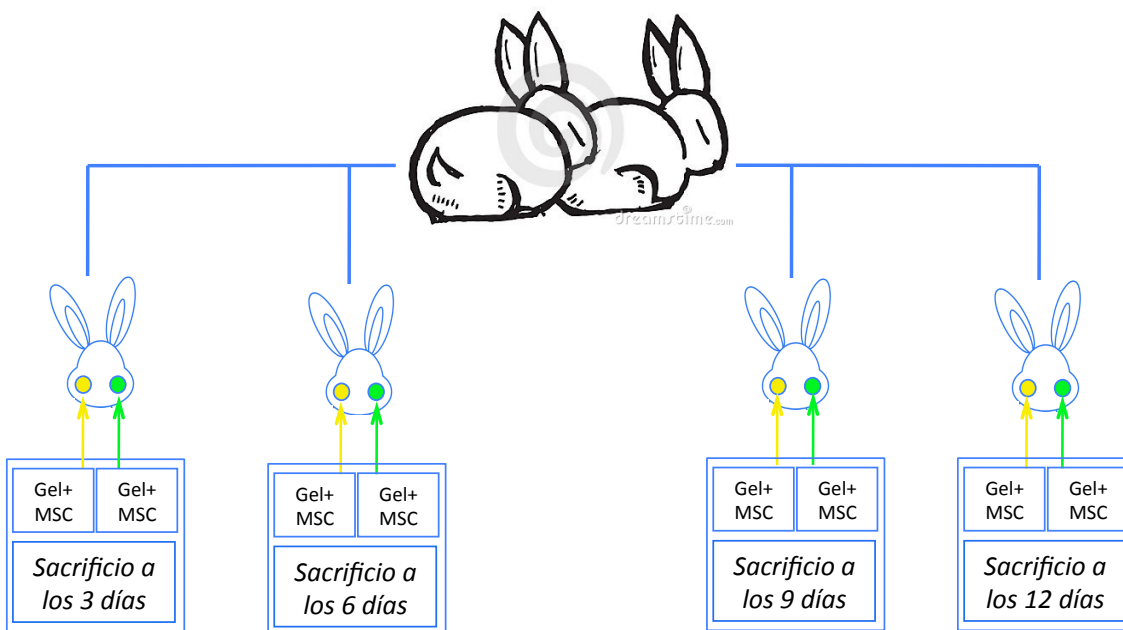


Figura 3.6. Diseño experimental. Evaluación de la permanencia de las Ad-MSC en hidrogel de plasma sanguíneo humano implantadas en defectos óseos mandibulares de conejos. Distribución de unidades experimentales y asignación de tratamientos a cada unidad experimental

3.2.2.2. Elaboración de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC

Se elaboró la matriz tridimensional de plasma sanguíneo humano con las Ad-MSC de sexto pasaje utilizadas en la fase *in vitro*. Como se describió anteriormente los componentes del hidrogel fueron : Plasma sanguíneo humano (33,2%), solución salina estéril (53,32%), ácido tranexámico (0,64%), suspensión de Ad-MSCs (6to pasaje) en DMEM 10 % de SFB (6,64%) y CaCl₂ estéril (6,64%).

Cada hidrogel tiene un volumen de 600µl y una concentración de 60.000 células por hidrogel. Las células fueron cultivadas con medio Dulbecco's Modified Eagle's medium low glucose (DMEM marca GIBCO™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB marca GIBCO™), penicilina 100U/ml, estreptomicina 100µg/ml e incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24 horas.

3.2.2.3. Procedimiento quirúrgico. Manejo y cuidado postoperatorio de los conejos. Sacrificio de los animales y toma de especímenes quirúrgicos

Los procedimientos quirúrgicos, los protocolos de medicación durante y después de las cirugías, el cuidado posoperatorio y el sacrificio de los animales se realizaron según los lineamientos ya expuestos en los puntos 3.3.1.2, 3.3.1.3 y 3.3.1.4.

3.2.2.4. Procesamiento Histológico

Se tomaron especímenes mandibulares que abarcaban el tamaño del defecto óseo inicial y el tejido duro y blando circundante. Se fijaron en una solución de formol al 10% en PBS, pH 7,4 a 4° C durante 72 horas. Luego, se descalcificaron en EDTA® durante dos meses, se deshidrataron en series ascendentes de etanol (70%-80%-90%- 100%) y se transfirieron a una solución de xilol al 100% por 30 minutos. Posteriormente, las muestras fueron embebidas en parafina y con ayuda de un micrótopo se obtuvieron cortes histológicos de cuatro micrómetros de espesor que se colocaron en láminas portaobjetos y se les realizó inmunohistoquímica. El procesamiento de las muestras se realizaron con el apoyo del el laboratorio de patología del Instituto Nacional de Salud.

3.2.2.5. Inmunohistoquímica

A las muestras debidamente cortadas y montadas en láminas portaobjetos con recubrimiento en polilisina, se les realizó lavados con xilol y alcohol y permanecieron en una solución de buffer tris, tripsina y cloruro dihidratado durante 30 minutos a 37°C. Se utilizó una solución peróxido de hidrógeno al 3% por 30 minutos como agente bloqueador para posteriormente sumergirlas en EDTA por 2 minutos. Se incubó en suero de caballo durante 20 minutos, con el anticuerpo primario por una hora en cámara húmeda (Mouse Anti human beta 2 microglobulin: HRP (AbD Serotec)), con el anticuerpo secundario (Biotinylated antimouse IgG (H+L) BA2000 (Vector)) y con el complejo ABC por 30 minutos (Vectastain Peroxidase Standard ABC kit). Luego se realizó el revelado con Diaminobenzidina (Dab Plus Substrate kit (Zymed Lab)) y se contrasta con hematoxilina.

3.2.3. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano elaborados con Medios Condicionados en defectos óseos mandibulares de conejos

3.2.3.1. Diseño Metodológico

Se emplearon 4 conejos machos de raza Nueva Zelanda de 3 meses de edad, con un peso aproximado de 2-3 Kg. En tres de ellos se implantaron hidrogeles de plasma sanguíneo humano elaborados con medios condicionados obtenidos a partir de Ad-MSC en defectos óseos mandibulares. Se utilizaron dos concentraciones distintas de medios condicionados (100µg/ml y 200µg/ml) en el mismo individuo. En un animal se implantó un hidrogel de plasma sanguíneo humano elaborado con medios condicionados en una concentración de 200µg/ml y en el otro lado se permitió el cierre de la herida por segunda intención (control). El sacrificio de los animales se realizó 45 días después del procedimiento quirúrgico (**Figura 3.7**).

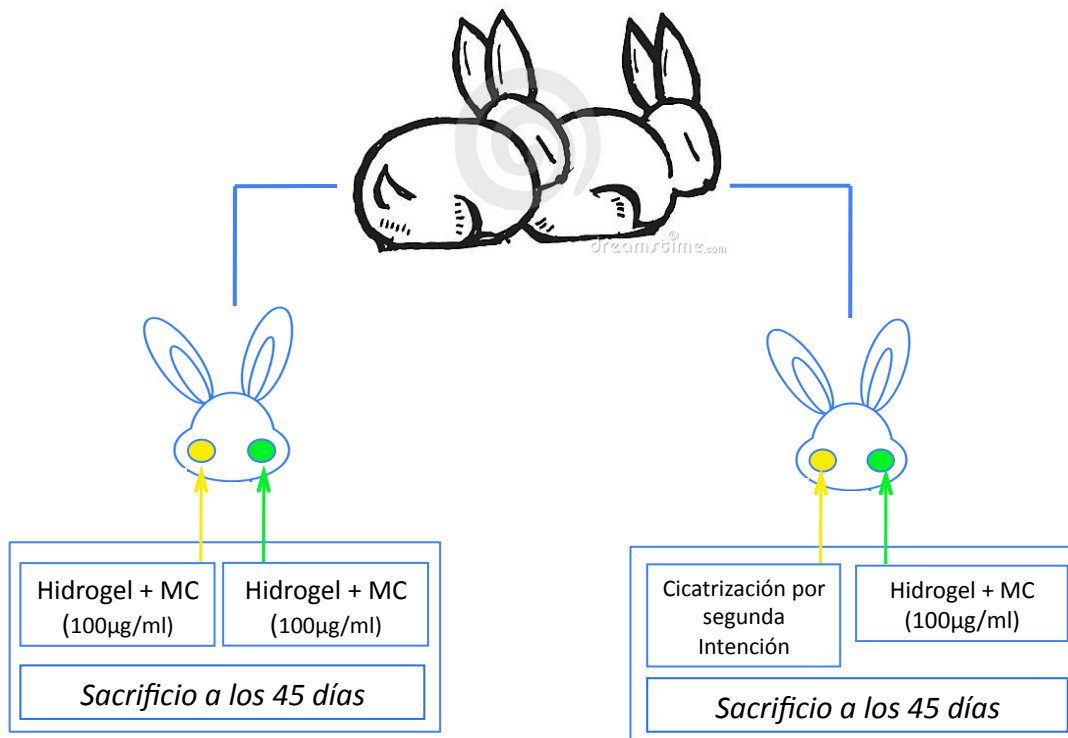


Figura 3.7. Diseño Experimental. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con medios condicionados en defectos óseos mandibulares de conejos. Distribución de unidades experimentales y asignación de tratamientos a cada unidad experimental

3.2.3.2. Procedimiento quirúrgico. Manejo y cuidado postoperatorio de los conejos. Sacrificio de los animales y toma de especímenes quirúrgicos

Los procedimientos quirúrgicos, los protocolos de medicación durante y después de las cirugías, el cuidado posoperatorio y el sacrificio de los animales se realizaron según los lineamientos ya expuestos en los puntos 3.3.1.2, 3.3.1.3 y 3.3.1.4.

3.2.3.3. Procesamiento Histológico

Se tomaron especímenes mandibulares que abarcaban el tamaño del defecto óseo inicial y el tejido duro y blando circundante. Se fijaron en una solución de formol al 10% en PBS, pH 7,4 a 4° C durante 72 horas. Luego, se descalcificaron en EDTA® durante dos meses, se deshidrataron en series ascendentes de etanol (70%-80%-90%- 100%) y se transfirieron a una solución de xilol al 100% por 30 minutos. Posteriormente, las muestras fueron embebidas en parafina y con ayuda de un micrótopo se obtuvieron cortes histológicos de cuatro micrómetros de espesor que se colocaron en láminas portaobjetos y se les realizó tinción con hematoxilina y eosina, tricrómico de masson y azul de tolouidina. El procesamiento de las muestras se realizaron con el apoyo del el laboratorio de patología del Instituto Nacional de Salud y de la Universidad Nacional de Colombia.

3.2.3.4. Análisis Histológicos

Para realizar las evaluaciones histológicas, se utilizó un microscopio de luz (Nikon ECLIPSE 55i, Nikon , Japón) y se tomaron fotografías con una cámara digital adaptada a éste (Digital sight DS-2Mv, Nikon, Japón), se uso el objetivo de 40X para obtener imágenes panorámicas de los cortes histológicos, 100X para realizar el conteo de células inflamatorias y evaluar el grado de inflamación. Las placas histológicas fueron analizadas llevando a cabo un estudio ciego en el cual participaron patólogos de entidades diferentes.

En las placas histológicas se evaluó el grado de inflamación, en cinco campos consecutivos se realizó el conteo de células inflamatorias y se cálculo el valor promedio para categorizar el grado de inflamación.

3.2.3.5. Análisis radiográficos

El progreso de regeneración ósea fue evaluado radiográficamente. Se tomaron radiografías de los especímenes quirúrgicos post mortem en el plano medio lateral. Se realizaron con el equipo de rayos X de la Clínica de Pequeños Animales de la Universidad Nacional de Colombia.

Capítulo 4

Resultados

Los resultados que se presentan en esta sección están divididos en dos partes. En la primera, evaluamos la proliferación y diferenciación osteogénica de las Ad-MSC en el interior de los hidrogeles de plasma sanguíneo humano y en la segunda, evaluamos el proceso de regeneración ósea en heridas quirúrgicas realizadas en mandíbulas de conejo cuando se implantaron Ad-MSC y medios condicionados.

4.1. Fase in vitro

4.1.1. Caracterización de la Ad-MSC en monocapa

4.1.1.1. Morfología y adherencia al plástico de las Ad-MSC

Entre la primera y segunda semana de cultivo se observaron células fibroblastoides adherentes al plástico adyacentes al explante de tejido adiposo. A partir de la tercera semana de cultivo, se observaron abundantes células que formaban una monocapa confluyente cubriendo la superficie de la caja de cultivo. Las células aisladas fueron expandidas en cultivo por tripsinización y pasajes seriales (**Figura 4.1**).

4.1.1.2. Caracterización por transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa

Entre los pasajes 4-6 se demostró la expresión de marcadores de superficie celular CD105, CD73, CD66 y CD44, característicos del linaje mesenquimal. Además, las células no expresaron el marcador CD34, característico del linaje hematopoyético (**Figura 4.2**).

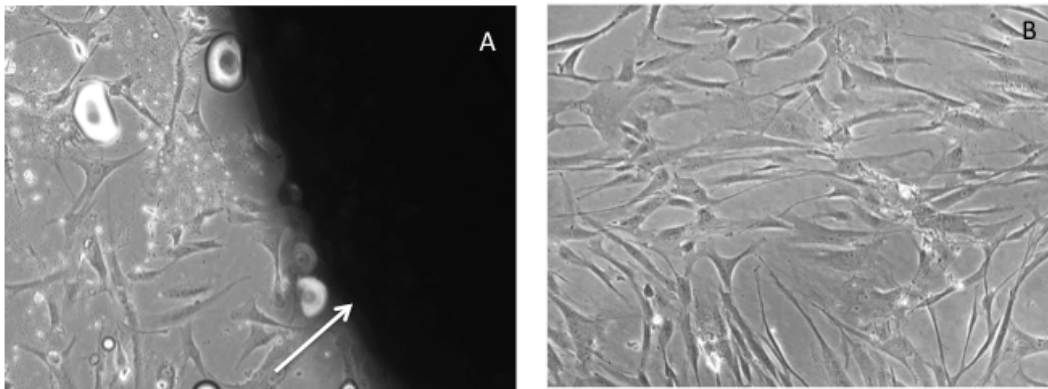


Figura 4.1. Obtención y cultivo de Ad-MSC a partir de tejido adiposo humano. **A**, semana 1, se observan células fibroblastoides adyacentes al explante de tejido adiposo (flecha blanca). **B**, semana 2 - 3, presencia de células adherentes al plástico con morfología homogénea y fibroblastoides. Magnificación 10X.

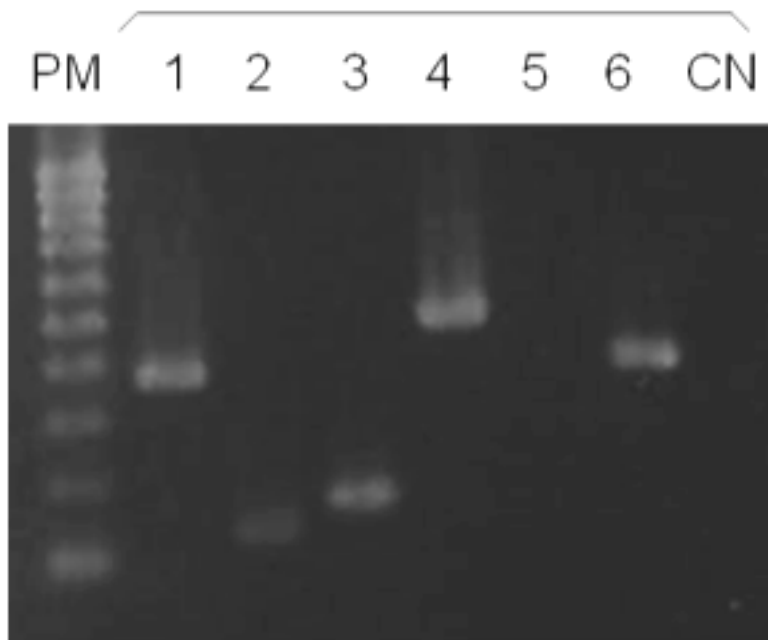


Figura 4.2. Caracterización de las Ad-MSC por RT-PCR. La expresión de marcadores de superficie característicos de MSCs humanas se determinó en las células aisladas de tejido adiposo de cuarto pasaje por RT-PCR. PM: patrón de peso de molecular de 100 pb. Línea 1: CD 105. Línea 2: CD73. Línea 3: CD166. Línea 4 : CD44. Línea 5: CD34. Línea 6: GAPDH. CN: Control negativo (Sin cDNA).

4.1.1.3. Caracterización por citometría de flujo

El fenotipo de las MSCs fue determinado por citometría de flujo evaluando la expresión de antígenos de superficie como CD105 y CD90 específicos del linaje mesenquimal,

CD45 y CD34 característicos de otros linajes y adicionalmente se analizó la expresión de HLA-ABC y HLA-DR.

Se adquirieron aproximadamente 10.000 eventos de la región que corresponden a una población celular similar en complejidad y tamaño. Se usaron como control las MSCs en cultivo sin marcar. La delimitación entre lo positivo de lo negativo se realizó a partir de los controles de isotipo. Las lecturas y análisis de los resultados se analizaron con el software FACS DIVA 6.11.

El porcentaje de células que presentaron antígenos de superficie del linaje hematopoyético fue menor al 1% (CD34 (0,1%) y CD45 (0,5%)), mientras que un mayor porcentaje de células presentaron antígenos de superficie representativos de linaje mesenquimal (CD105 (52,2%) y CD90 (99,7%)). Además, fueron positivas en un 11,5% para HLA I y en un 0,1 % de HLA II (**Figura 4.3**).

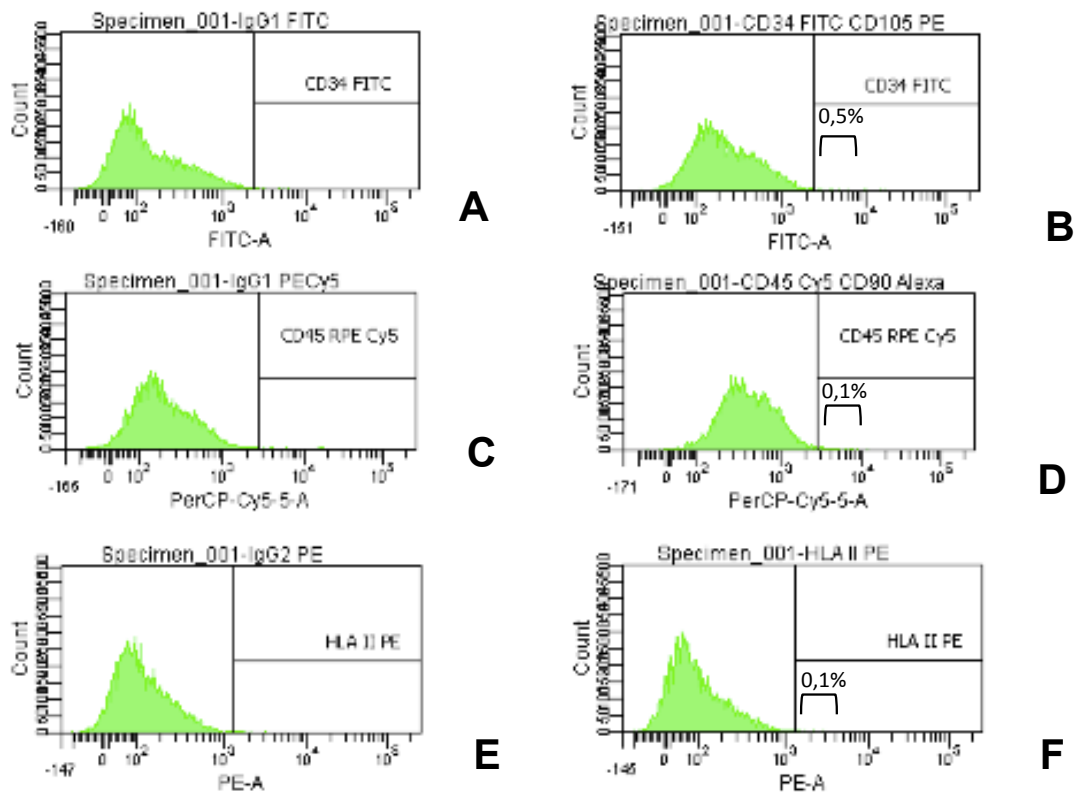


Figura 4.3 Caracterización de las células Ad-MSC por citometría de flujo. Las células mesenquimales obtenidas a partir de tejido adiposo de sexto pasaje y en 70% de confluencia, se marcaron con anticuerpos monoclonales y fueron analizadas por citometría de flujo. Podemos observar en la columna de la derecha los controles negativos para cada uno de los marcadores y en la columna de la izquierda las MSCs. **A**, control negativo para CD34 FITC. **B**, células marcadas con CD34 FITC. **C**, control negativo para CD45-RPECy5. **D**, células marcadas con CD45-RPECy5. **E**, control negativo para HLA II-RPE. **F**, células marcadas con HLA II-RPE.

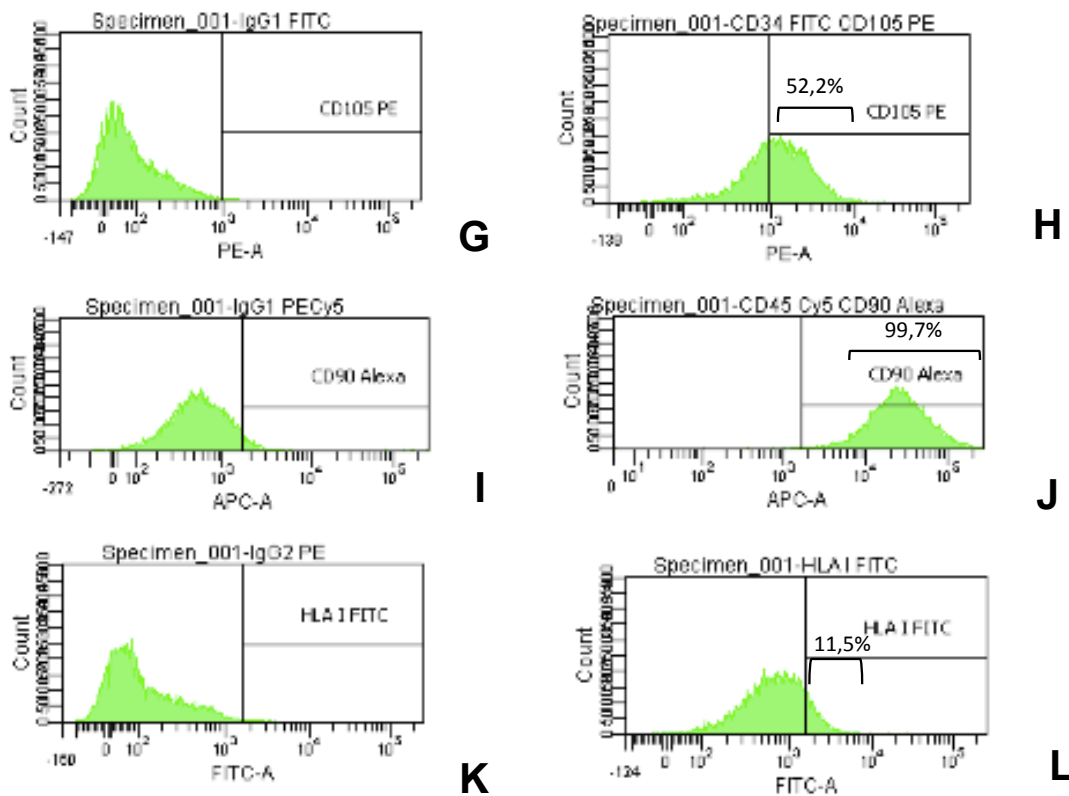


Figura 4.3 Caracterización de las células Ad-MSC por citometría de flujo (continuación. **G**, control negativo para CD105-PE. **H**, células marcadas con CD105-PE. **I**, control negativo para CD90-Alexa. **J**, células marcadas con CD90-Alexa. **K**, control negativo para HLA I-FITC. **L**, células marcadas con HLA I-FITC.

4.1.2. Diferenciación osteogénica de Ad-MSC en monocapa

La capacidad de diferenciación ósea fue determinada por la detección de la enzima fosfatasa alcalina, marcador temprano del fenotipo osteoblástico y la mineralización de la matriz extracelular como marcador de la funcionalidad celular.

Después de la primera semana de inducción osteogénica se detectó la presencia de la fosfatasa alcalina con la tinción de Fast Red TR en los cultivos celulares tratados con medio de inducción y la no expresión de esta enzima en las células no inducidas (control). Después de la tercera semana de cultivo con el medio de inducción osteogénico pudimos observar los depósitos de mineralización ósea de color oscuro, ya que la plata utilizada en la tinción de Von Kossa se deposita en complejos de calcio dotados de grupos fosfatos presentes en la matriz producida por las células en cultivo. La plata una vez depositada en estos complejos, es reducida por la luz y los complejos fosfato unidos al calcio se pueden observar de color negro. Estos depósitos de calcio también los pudimos visualizar con la tinción de Alizarin Red. Las Ad-MSC no inducidas (control) fueron negativas para la tinción de Alizarin Red y Von Kossa (Figura 4.4).

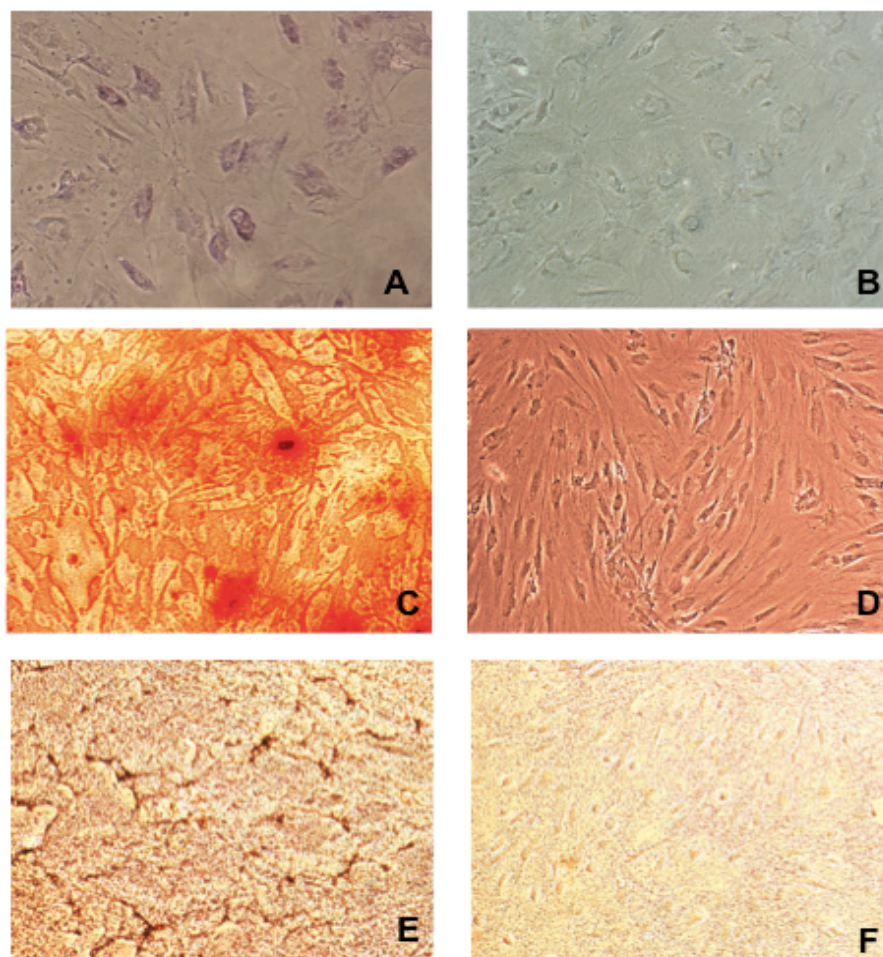


Figura 4.4 Diferenciación Osteogénica de las Ad-MSC. Las células fueron cultivadas en medio de diferenciación osteogénica y en medio convencional por tres semanas. **A y B**, tinción Fast Red RT. **A**, la capacidad de diferenciación ósea fue determinada por la detección de fosfatasa alcalina (Violeta) a la primera semana de cultivo con medio de diferenciación osteogénica. **B**, control negativo, células sin inducción. **C y D**, tinción de Alizarin Red S. **C**, la mineralización de la matriz extracelular fue evidenciada por la detección de depósitos de calcio (Rojo) a la tercera semana de inducción. **D**, control negativo, células sin inducción. **E y F**, tinción de Von Kossa. **E**, la diferenciación ósea se detectó por los depósitos de calcio (café oscuro) a la tercera semana de inducción. **F**, control negativo, células sin inducción. Magnificación 10X.

4.1.3. Ensayo de Proliferación celular en monocapa

La curva de crecimiento celular mostró una baja expansión desde el segundo hasta el quinto día. A partir del sexto día las células comienzan a proliferar rápidamente, entrando a la fase logarítmica de crecimiento que continua hasta el día doce, momento de finalización de el ensayo (**Figura 4.5**).

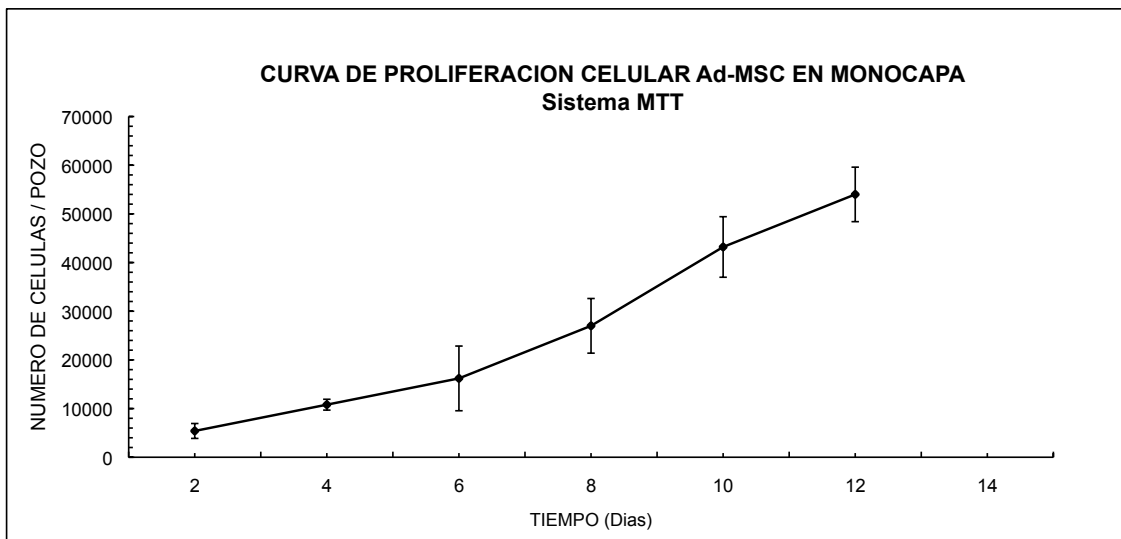


Figura 4.5 Análisis de proliferación celular de las Ad-MSC en Monocapa: Las Ad-MSC fueron cultivadas en una concentración de 9500 células por pozo. Posteriormente se detectó la presencia de formazán con el ensayo Vybrant® MTT Cell proliferation assay kit (Invitrogen™ V-13154). Se realizaron lecturas entre los días 1 y 12 de cultivo.

4.1.4. Cultivo de las Ad-MSC en hidrogeles de plasma sanguíneo humano

El hidrogel de plasma sanguíneo humano exhibe una composición homogénea, sin sedimentos ni turbidez; esta transparencia permite la visualización microscópica de las MSCs durante su proliferación y diferenciación. Es de fácil manipulación y permanece estable durante el periodo de tiempo programado para el estudio. Las células presentan una morfología fibroblastoide a partir del segundo día después de la siembra y se observa claramente como se adecúan satisfactoriamente a su nuevo entorno.

Al análisis de la microscopía electrónica de barrido se observa la morfología del hidrogel de plasma sanguíneo humano. Las redes de fibrina forman una estructura tridimensional que genera un enmallado con poros interconectados entre si, que presentan un diámetro promedio entre 20 a 30 μm (**Figura 4.6**), lo que concuerda con los reportes de la literatura como un tamaño de poro aceptable para que las células puedan colonizar y proliferar adecuadamente en una matriz (Linnes et al., 2007; Willerth et al., 2006).

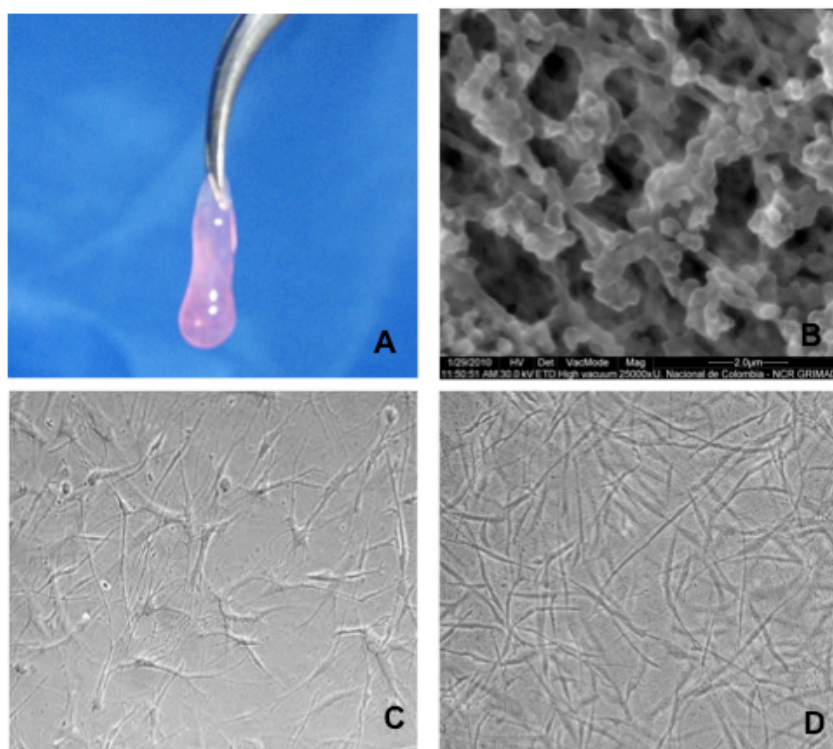


Figura 4.6 Cultivo de las Ad-MSC en hidrogeles de plasma sanguíneo humano: **A**, el hidrogel de plasma sanguíneo humano exhibe una composición homogénea, sin sedimentos ni turbidez, transparente y de fácil manipulación. **B**, microscopía electrónica de barrido: Sección representativa del hidrogel de plasma sanguíneo humano donde se observan las MSCs adheridas a las redes de fibrina que forman una estructura tridimensional con poros interconectados entre si. Magnificación 25000X. **C**, día 2 de cultivo de las Ad-MSC en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. **D**, día 7 de cultivo de las Ad-MSC en hidrogeles de plasma sanguíneo humano, Magnificación 10X.

4.1.5. Evaluación in vitro de la proliferación celular con el sistema Hoeshst

Después de la tinción de las células con el colorante Hoeshst, al tratar de visualizar las células en el microscopio confocal, fue imposible distinguir claramente las células marcadas del hidrogel, ya que el colorante Hoeshst difunde rápidamente en el hidrogel generando una coloración uniforme que no permite la distinción de las células en su interior. Se realizaron diferentes ensayos variando la concentración del colorante y aumentando el número de lavados tanto de las células como de los hidrogeles, pero aún así no fué posible realizar un conteo consistente de las células en el hidrogel.

4.1.6. Evaluación in vitro de la proliferación celular con el sistema DAPI

Al igual que con el colorante Hoeshst la difusión del colorante hacia la matriz hace imposible un recuento confiable de las células a pesar de aumentar el número de lavados tanto de las células como de los hidrogeles.

4.1.7. Evaluación in vitro de la proliferación celular con el sistema Vybrant CFDA

Las células fueron cultivadas en hidrogeles de plasma sanguíneo humano previo marcaje con el sistema Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit. La proliferación de las células sembradas fue medida desde el día 0 hasta el día 18 de cultivo. El conteo celular se realizó de forma manual con las imágenes digitales obtenidas con el microscopio confocal N1-Plus Marca NIKON empleando un filtro de excitación de 488 nm y un filtro de emisión de 515 nm y con la ayuda del software NIS ELEMENTS AR 3.0 (Nikon, Chiyoda-Ku, Tokyo, Japan) se realizó una reconstrucción tridimensional de una zona representativa de cada uno de los pozos de cultivo, logrando visualizar volumétricamente las células marcadas presentes en el interior del hidrogel. Recién sembradas las células se observan con una morfología redondeada que va cambiando a una fibroblastoide, de tal forma, que al tercer día ya podemos observar las prolongaciones citoplasmáticas típicas de las Ad-MSK en cultivo. Es evidente un aumento progresivo en el número de células desde el primer día hasta el sexto día, a partir de este momento es imposible lograr distinguir claramente las células marcadas del hidrogel, ya que el colorante difunde en el hidrogel generando una coloración uniforme que no permite la visualización de las células en su interior (**Figura 4.7**).

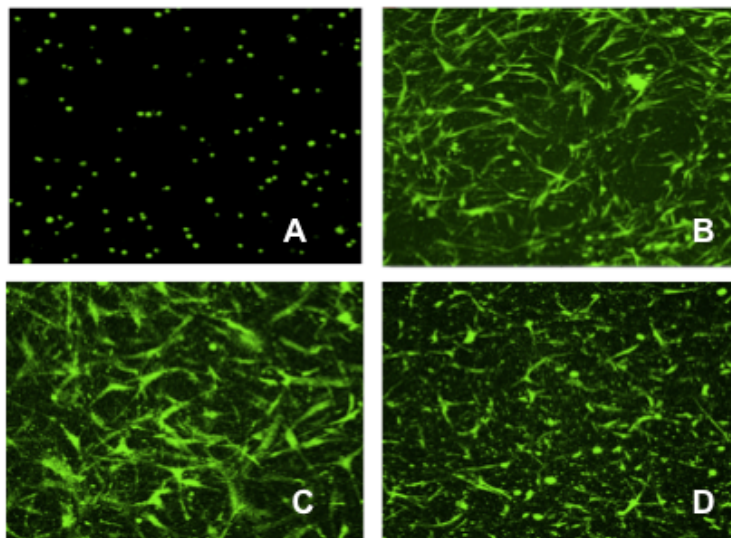


Figura 4.7 Proliferación de las Ad-MSK en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. Las células fueron cultivadas en hidrogeles de plasma sanguíneo humano previo marcaje con el sistema Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit. La proliferación de las células sembradas fue medida desde el día 0 hasta el día 18 de cultivo. **A**, día 1. **B**, día 3. **C**, día 6. **D**, día 9.

4.1.8. Evaluación in vitro de la proliferación celular con MTT.

4.1.8.1. Elaboración de la curva patrón

En la Figura 4.8 se grafica la relación entre los promedios de la absorbancia medida a una longitud de onda de 570 nm y densidades conocidas de células madre mesenquimales por pozo evaluadas con MTT. El coeficiente de correlación obtenido ($R= 0,9908$) a partir del coeficiente de determinación R^2 , muestra que hay un grado de asociación lineal entre el número de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y la reducción del colorante a formazan; por lo tanto, esta gráfica puede usarse para calcular el número de células por pozo (**Figura 4.8**)

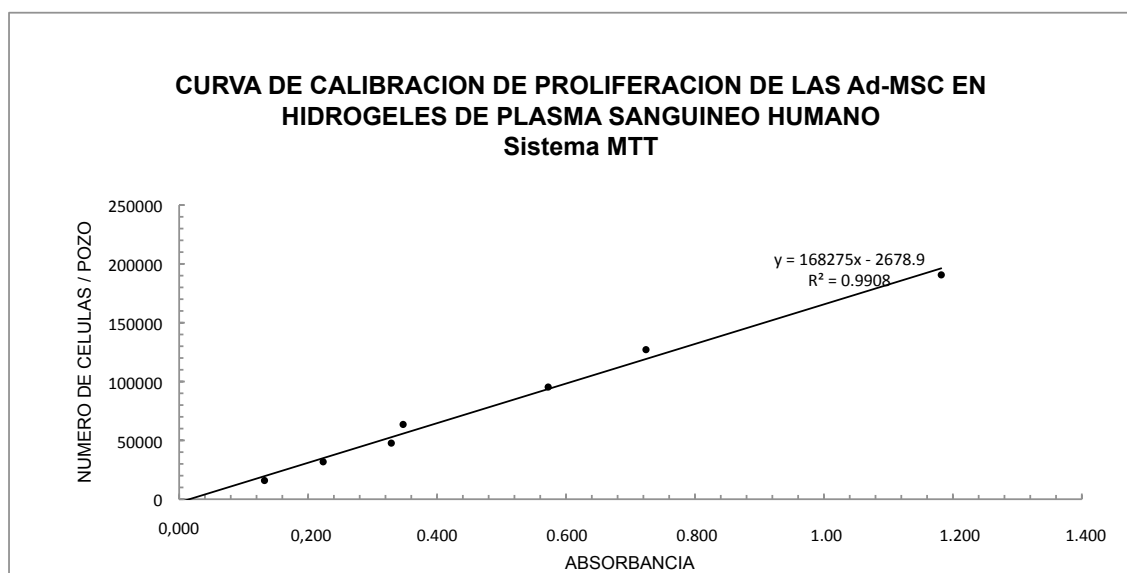


Figura 4.8 Curva patrón de proliferación celular con MTT: Se colocó la solución de MTT en pozos con un número determinado de células. Se graficó la media de los valores de absorbancia medida en cada muestra a 570nm.

4.1.8.2. Evaluación de la proliferación celular in Vitro

Se midieron las absorbancias de los cultivos tratados con MTT a los tiempos indicados en la Sección de Materiales y Métodos. Estas absorbancias se interpolaron en la curva patrón y se obtuvo el número de células madre mesenquimales en función del tiempo. Como se observa en la **Figura 4.9**.

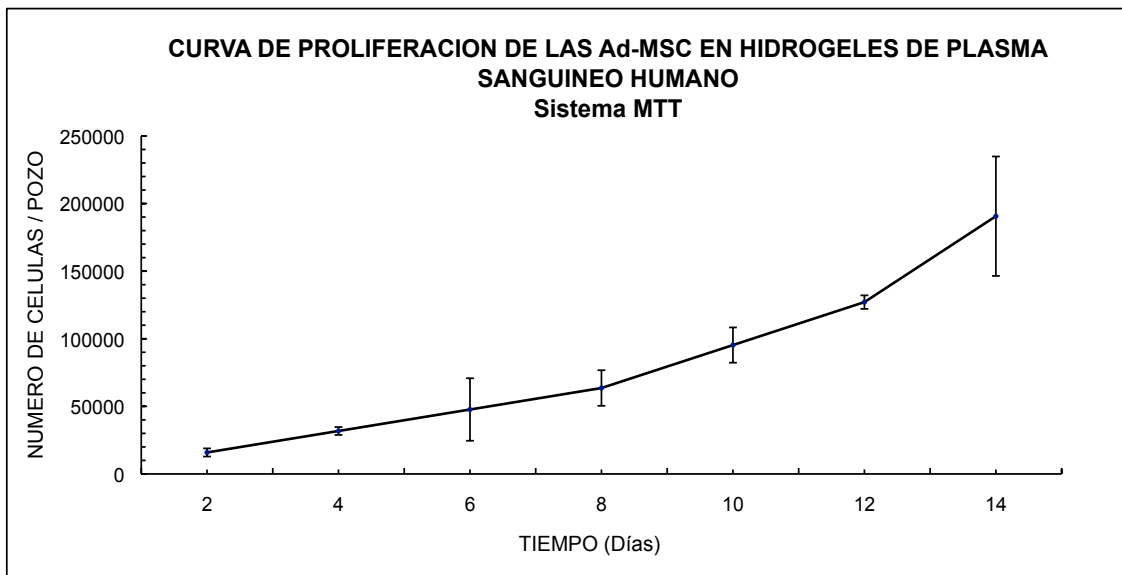


Figura 4.9 Curva de Proliferación celular: Evaluación de proliferación de Ad-MSCs sembradas en los hidrogeles de plasma sanguíneo humano por el método del MTT. La proliferación de las células sembradas fue medida desde el día 0 hasta el día 14 de cultivo (Media \pm DS).

4.1.9. Diferenciación osteogénica de Ad-MSC en hidrogeles de plasma sanguíneo humano

Se detectó la presencia de la enzima fosfatasa alcalina, marcador temprano del fenotipo osteoblástico, después de la primera semana de inducción osteogénica, con la tinción de Fast Red TR en los cultivos celulares tratados con medio de inducción y la no expresión de esta enzima en las células no inducidas (control).

Después de la tercera semana de cultivo con el medio de inducción osteogénica observamos los depósitos de mineralización ósea de color oscuro, con la tinción de Von Kossa. Las Ad-MSC no inducidas (control) fueron negativas para esta tinción (**Figura 4.10**).

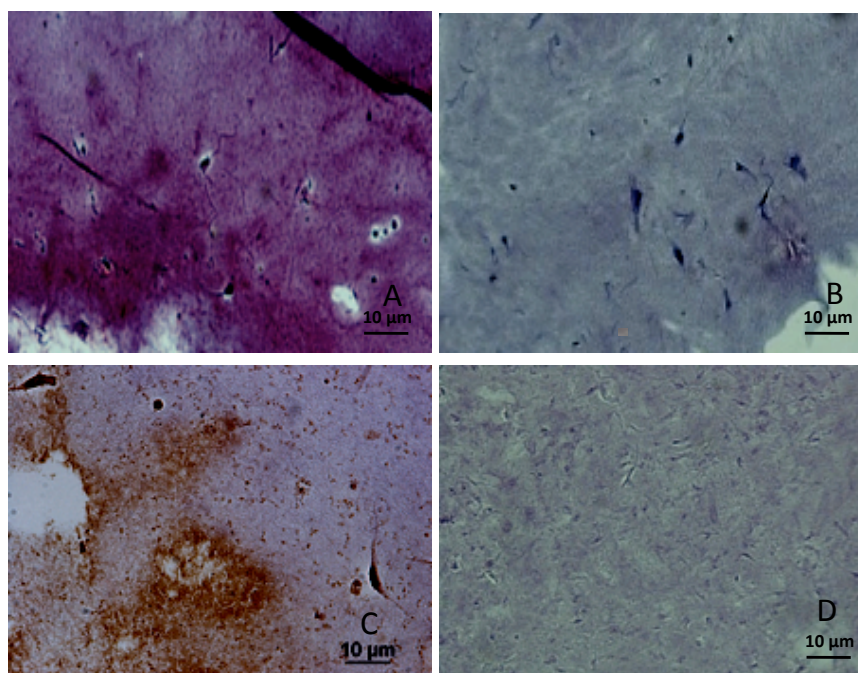


Figura 4.10 Diferenciación Osteogénica de las Ad-MSc en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. Las células fueron cultivadas en medio de diferenciación osteogénica y en medio convencional por tres semanas. **A** y **B**, tinción Fast Red RT. **A**, la capacidad de diferenciación ósea fue determinada por la detección de fosfatasa alcalina (Violeta) a la primera semana de cultivo con medio de diferenciación osteogénica. **B**, control negativo, células sin inducción. **C** y **D**, tinción de Von Kossa. **C**, a la tercera semana de inducción la diferenciación ósea se detectó por los depósitos de calcio (café oscuro). **D**, control negativo, células sin inducción. Magnificación 40X.

El hidrogel de plasma sanguíneo presentó las características físicas y biológicas necesarias para el cultivo de las Ad-MSc, proporcionando una estabilidad superior a tres semanas, permitiendo la supervivencia y proliferación celular. Además, se demostró que las Ad-MSc conservan su capacidad de diferenciación hacia el linaje óseo en el interior del hidrogel de plasma sanguíneo humano. Estas características: supervivencia, proliferación y diferenciación osteogénica, fueron fundamentales en el desarrollo del diseño metodológico del estudio ya que era necesario garantizar la viabilidad y diferenciación celular en el hidrogel para la posterior implantación de los constructos en el modelo animal.

4.2. Fase in vivo

4.2.1. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSc en defectos óseos mandibulares de conejos

Un primer grupo de 21 conejos fue empleado para comparar la regeneración tisular de heridas óseas creadas quirúrgicamente en las mandíbulas. En el mismo individuo, en el lado tratado se implantaron hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSc y en

el lado contralateral (control) se les injertó el hidrogel de plasma sanguíneo humano sin células. Después de realizados los tratamientos quirúrgicos se subdividió la población en 4 grupos según el sacrificio de los animales a los 15, 30, 45 y 60 días respectivamente. Como control negativo se empleó un conejo en donde se realizó el mismo procedimiento quirúrgico y se implantó en un lado la matriz de plasma sanguíneo humano sin células y en el otro lado se permitió el cierre por segunda intención. Este individuo se sacrificó a los 45 después de operado.

4.2.1.1. Análisis Radiográfico

La figura 4.11 muestra imágenes representativas de los defectos óseos bilaterales a los días 0, 15, 45 y 60. En el día cero se muestra el tamaño del defecto óseo inicial delimitado por una línea amarilla. En el día 15 se observa un leve cambio en la densidad en el borde interno del defecto óseo de manera bilateral. En el día 45, en el defecto óseo control, se ve una zona radiopaca en los bordes internos del defecto óseo. En el lado tratado con el hidrogel con las Ad-MSC se observa una zona radiopaca de mayor densidad y tamaño. En el día 60, en el defecto óseo control se observa un predominio de una zona radiolúcida con pequeñas zonas radiopacas en su interior, mientras que en el lado tratado con células, se evidencia una zona radiopaca mucho más grande que cubre casi la totalidad del defecto óseo intercalada con pequeñas zonas radiolúcidas en su interior (**Figura 4.11**). El análisis de las radiografías laterales de cráneo y periapicales de la zona injertada fue realizado en colaboración con un radiólogo experto.

En la **Figura 4.12**, se presentan imágenes radiográficas de los diferentes tratamientos 45 días después de la intervención quirúrgica. En el panel A se observa el tamaño inicial del defecto óseo circunscrito con línea amarilla. El panel B se trata de un defecto óseo al cual se le permitió la cicatrización por segunda intención en el que se observa un pequeño halo radiopaco hacia los bordes del defecto óseo. El panel C corresponde al defecto óseo en el que se implantó el hidrogel sin células, en donde se observa una zona radiopaca mucho mayor que se dirige de la periferia hacia el centro de la lesión y en el panel D, se observa una zona radiopaca que cubre más del 70% de el tamaño del defecto óseo inicial. Este último panel corresponde a la herida quirúrgica a la cual se le aplicó hidrogel con Ad-MSC.

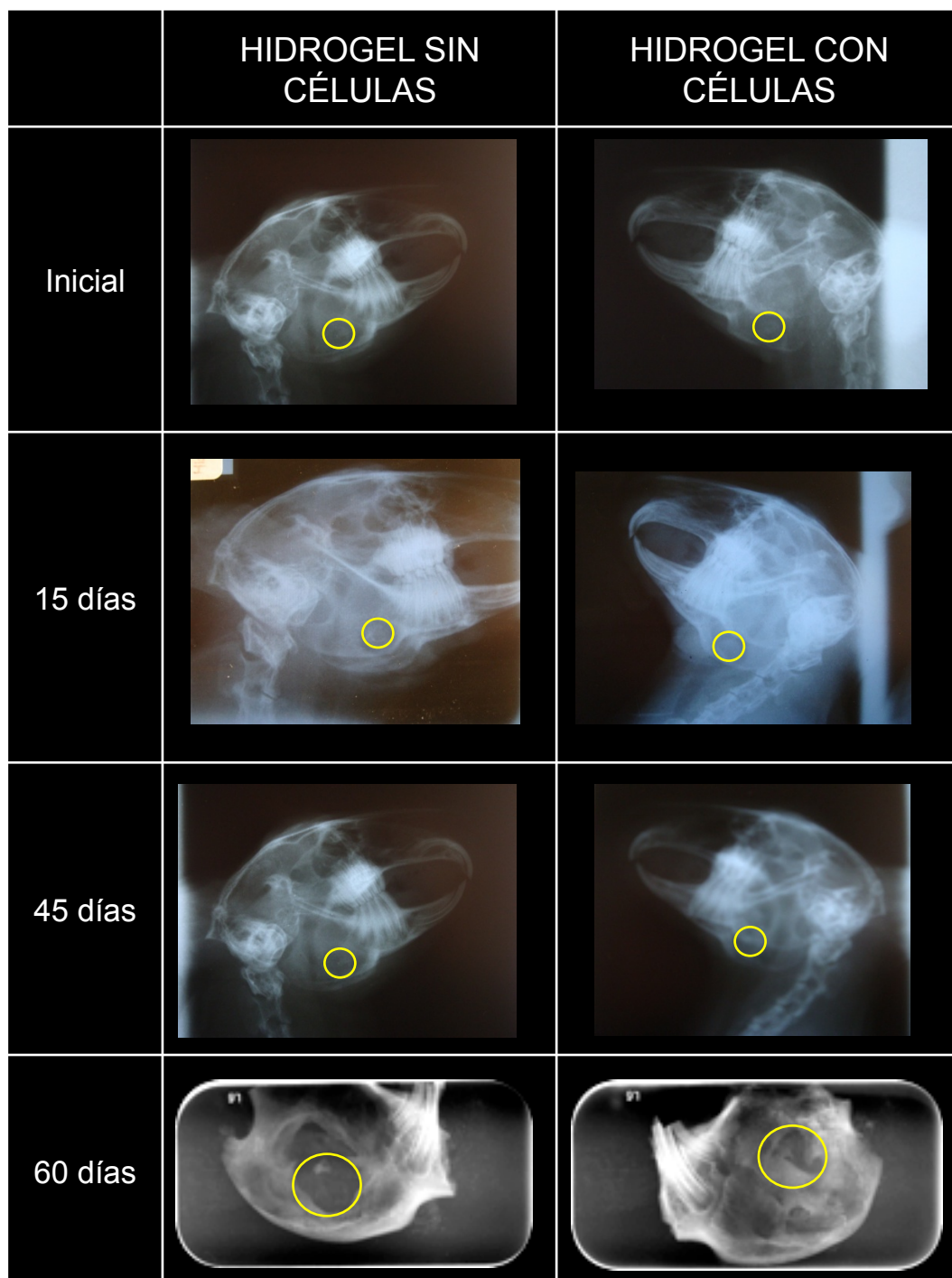


Figura 4.11. Seguimiento Radiográfico de defectos óseos: Imágenes radiográficas de defectos óseos tratados con hidrogeles de plasma sanguíneo humano sin Ad-MSC (control) y defectos tratados con el hidrogel con células a los días 0, 15, 45 y 60. El círculo amarillo corresponde a el tamaño del defecto óseo inicial

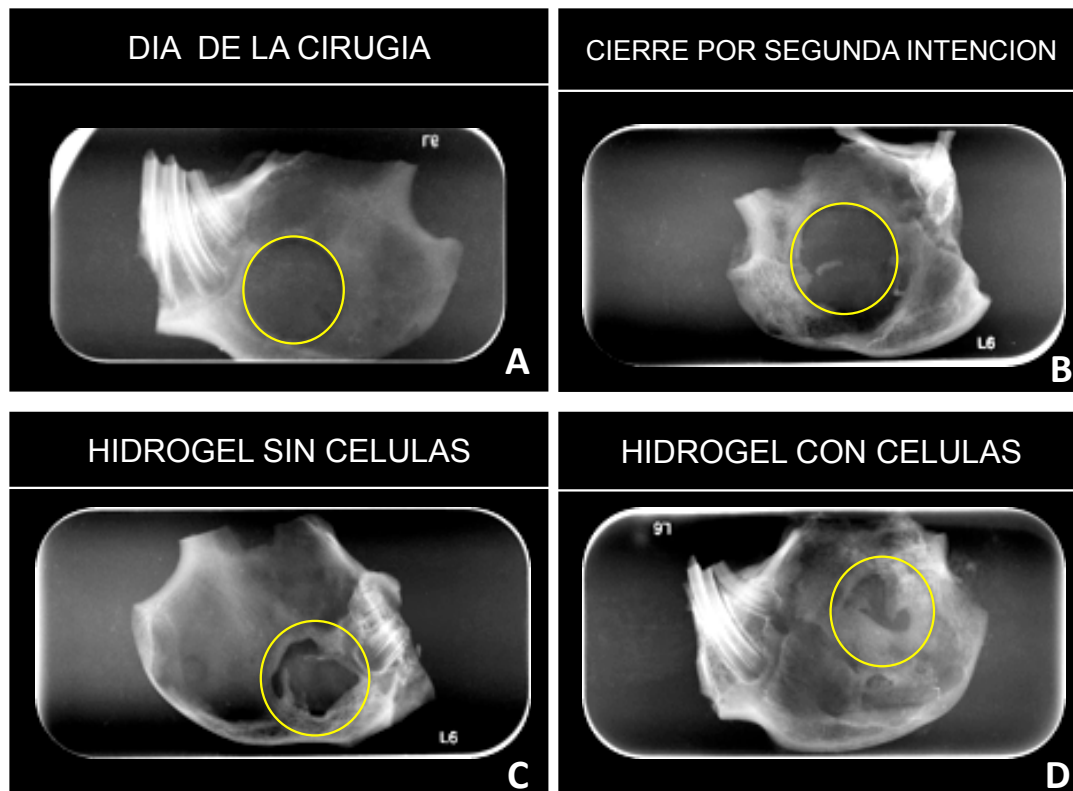


Figura 4.12 Comparación de imágenes radiográficas de defectos óseos con diferentes tratamientos. **A**, tamaño inicial de la herida quirúrgica. **B**, cicatrización por segunda intención a los 45 días. **C**, defecto óseo tratado con hidrogel sin células a los 45 días. **D**, defecto óseo tratado con hidrogel con Ad-MSC a los 45 días. El círculo amarillo representa el tamaño inicial del defecto óseo.

Area total de hueso neoformado: En las imágenes digitales tomadas en cada uno de los tiempos definidos, se calculó el área del tejido óseo neoformado en mm^2 con ayuda del programa Image J 1.410 (National Institutes of Health, USA). El porcentaje de tejido óseo se calculó con la Ecuación 4.1

Ecuación 4.1 Porcentaje del tejido óseo neoformado

$$\text{Tejido óseo neoformado} = (\text{Area defecto óseo inicial} - \text{Area defecto óseo final}) \times 100$$

En la **Figura 4.13** se grafica el porcentaje de formación de tejido óseo tanto en el grupo control como en el que se aplicó hidrogel con células madre a los días 15, 30, 45 y 60. Los datos obtenidos evidencian una progresiva reducción de las áreas tratadas. Se observó que a los 15 días después del procedimiento quirúrgico, el lado tratado presenta un porcentaje de formación ósea del 49% mientras que el lado control presenta un porcentaje del 16%. A los 30 días el lado tratado muestra un porcentaje de neoformación del 60% comparado con un 33% del lado no tratado. A los 45 días el porcentaje de nue-

vo tejido en el lado tratado aumentó levemente a un 64% y el del lado control a un 41%. Ya en el día 60 el defecto óseo en el lado injertado con Ad-MSC presentó un porcentaje de formación ósea del 91% mientras que el lado control presentó un porcentaje del 62%. En los cuatro periodos se encuentran mayores porcentajes de formación de tejido óseo en los conejos en el que se aplicó hidrogel con células madre.

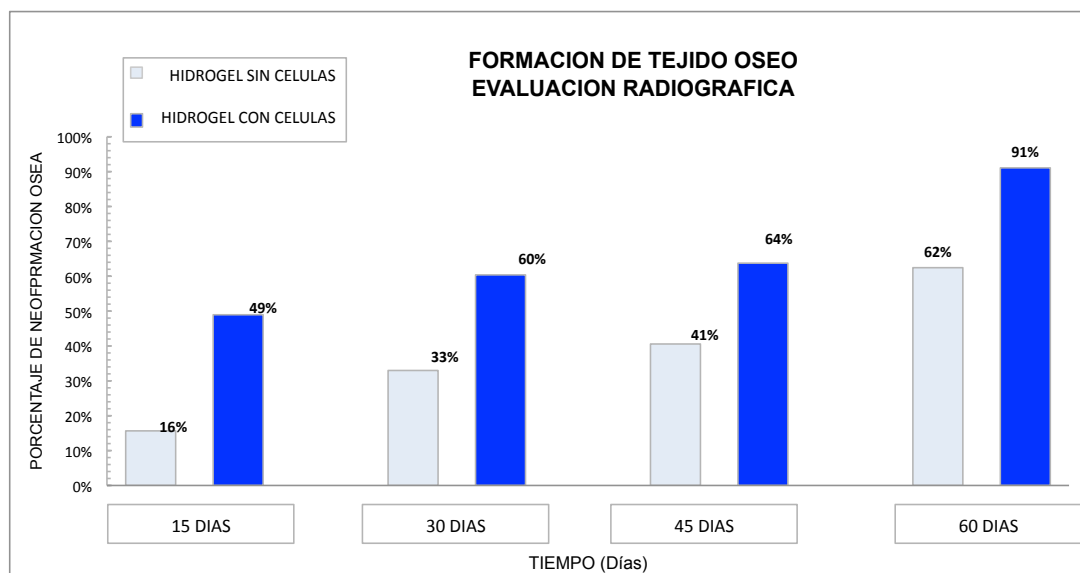


Figura 4.13 Evaluación radiográfica de la neoformación de tejido óseo. Evaluación radiográfica del porcentaje de tejido óseo neoformado a los 15, 30, 45 y 60 días después de haber injertado hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC (azul oscuro) e hidrogeles de plasma sanguíneo humano sin células Ad-MSC (azul claro).

Densidad ósea : Según la escala ordinal utilizada para la medición de la densidad ósea del nuevo tejido formado en el defecto en cada intervalo de tiempo, se logró establecer que durante los primeros 15 días la densidad ósea tanto en el lado control como en el lado tratado fue menor a la del hueso medular adyacente. A los 30 días la densidad

ósea del lado control continúa siendo menor a la del hueso medular adyacente mientras que la del lado tratado es mayor o igual al hueso medular adyacente pero menor que la hueso cortical, condición que se mantiene de manera similar en ambos lados hasta los 45 días. A los 60 días, el tejido óseo del lado tratado con las Ad-MSC logra una densidad mayor o igual a la del hueso cortical adyacente a diferencia del lado control que se mantiene en una densidad menor a la del hueso medular adyacente (**Figura 4.14**).

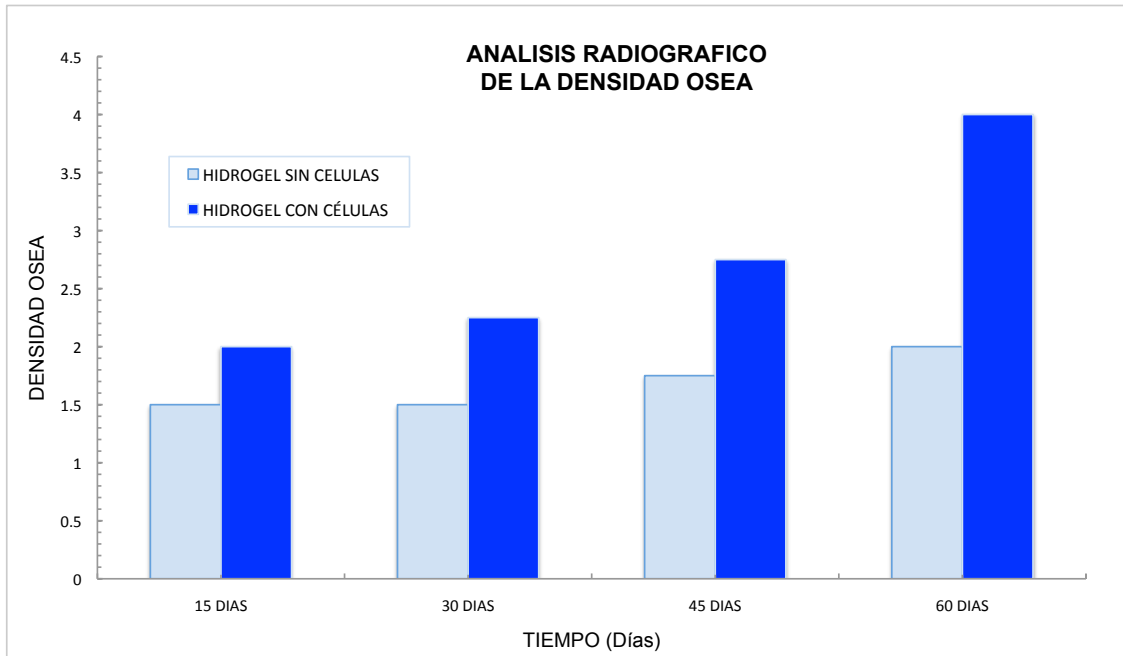


Figura 4.14 Evaluación radiográfica de la densidad ósea. Evaluación radiográfica la densidad ósea del tejido neoformado a los 15, 30, 45 y 60 días después de haber injertado hidrogel de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC (azul oscuro) e hidrogel de plasma sanguíneo humano sin células Ad-MSC (azul claro).

4.2.1.2. Análisis Morfométrico

La **Figura 4.15**, muestra imágenes representativas de los especímenes quirúrgicos a los 15, 30 y 45 días. En el día 15 se observa bien delimitado el defecto óseo con gran cantidad de tejido de granulación en su interior tanto en el lado tratado como en el lado control. A los 30 días se evidencia un mayor cierre de el defecto óseo inicial en los dos lados, sin embargo este es mayor en el lado donde se injerto el hidrogel con Ad-MSC. A los 45 días es evidente el mayor porcentaje de formación de tejido óseo en el lado tratado con Ad-MSC, como se puede observar en la **Figura 4.16** donde se delineó el tamaño del defecto óseo inicial, el tamaño del defecto óseo final y el área de tejido óseo neoformado.

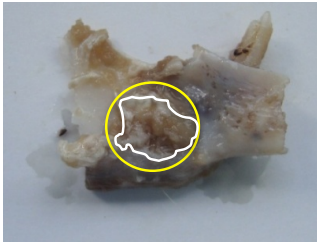
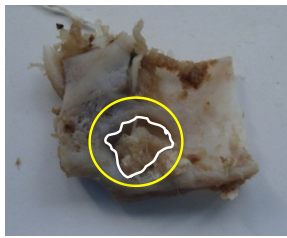
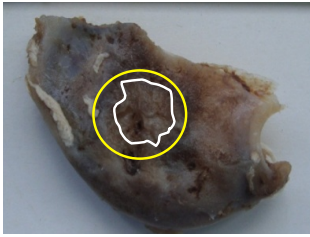
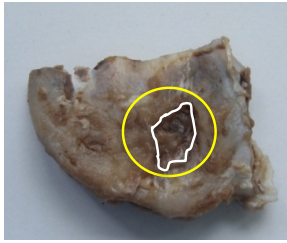
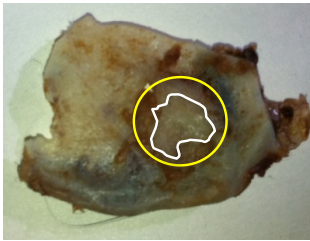
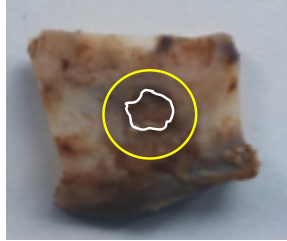
	HIDROGEL SIN CÉLULAS	HIDROGEL CON CÉLULAS
15 días posoperatorio		
30 días posoperatorio		
45 días posoperatorio		

Figura 4.15 Especímenes quirúrgicos de la zona del defecto óseo. Imágenes representativas de los especímenes quirúrgicos a los 15, 30 y 45 días posoperatorios. Los círculos amarillos representan el tamaño inicial del defecto óseo y la línea blanca representa el tamaño final del defecto óseo.

Para establecer si se encontraban diferencias entre los distintos tratamientos se hizo un análisis descriptivo y se graficaron los promedios y desviaciones estándar del porcentaje de neoformación ósea medido morfométricamente en cada grupo experimental como aparece en la **Tabla 4.1** y en la **Figura 4.17**. Se encuentra que el promedio del porcentaje de neoformación ósea es mayor en el lado en el que se aplicó hidrogeles de plasma sanguíneo con Ad-MSC en los 4 tiempos al compararlos con el lado control. El análisis estadístico indica que existen diferencias significativas ($p=0,004$) entre los diferentes tratamientos: hidrogel con Ad-MSCs e hidrogel sin Ad-MSCs. Al comparar los dos tratamientos en cada periodo de tiempo se observa que con un 95% de confianza, hay diferencias significativas en el grupo de 15 días ($p=0,006$) y de 45 días ($p=0,007$).

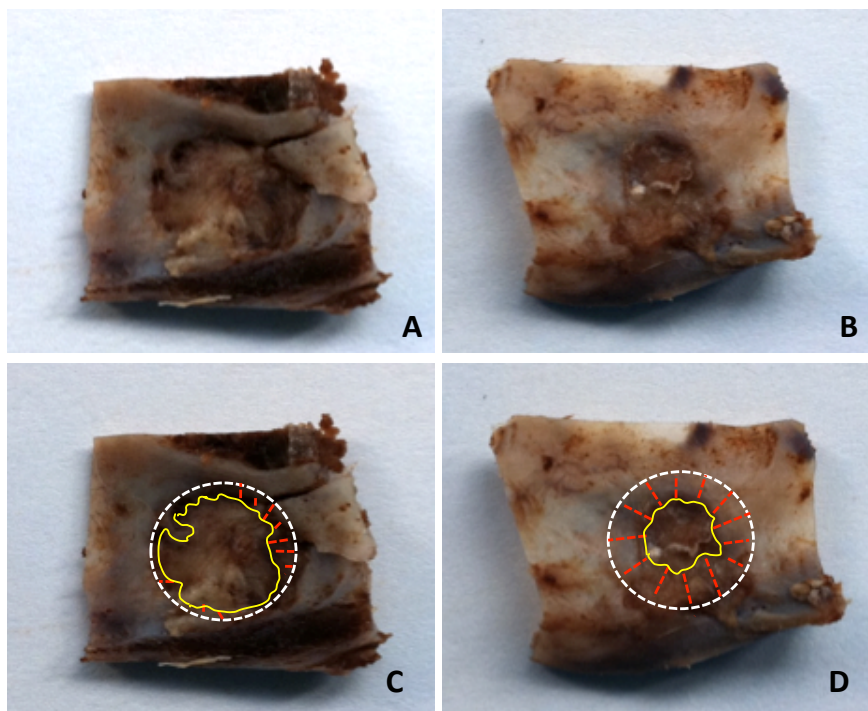


Figura 4.16 Análisis Morfométrico de neof ormación de tejido óseo. **A**, espécimen quirúrgico donde se evidencia el defecto óseo 45 días después de la implantación de hidrogel de plasma sanguíneo humano en sin Ad-MSC. **B**, espécimen quirúrgico donde se observa defecto óseo 45 días después de la implantación de hidrogel de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC. **C** y **D**, diagramación esquemática de la regeneración ósea de los especímenes quirúrgicos observados en los paneles **A** y **B** respectivamente, la línea punteada blanca representa el tamaño inicial del defecto óseo, la línea continua amarilla representa el tamaño final del defecto óseo y las líneas rojas representan el área de hueso neof ormado.

Tabla 4.1 Estadísticos descriptivos del porcentaje de reconstrucción de hueso medido morfométricamente

PERIODO	GRUPO	n	MEDIA (+/-DS)
15 días	Hidrogel sin Células Madre	4	23 (+/- 13)
15 días	Hidrogel con Células Madre	4	54 (+/- 9)
30 días	Hidrogel sin Células Madre	4	40 (+/- 18)
30 días	Hidrogel con Células Madre	4	60 (+/- 16)
45 días	Hidrogel sin Células Madre	4	32 (+/- 16)
45 días	Hidrogel con Células Madre	4	62 (+/- 7)
60 días	Hidrogel sin Células Madre	1	59
60 días	Hidrogel con Células Madre	1	100

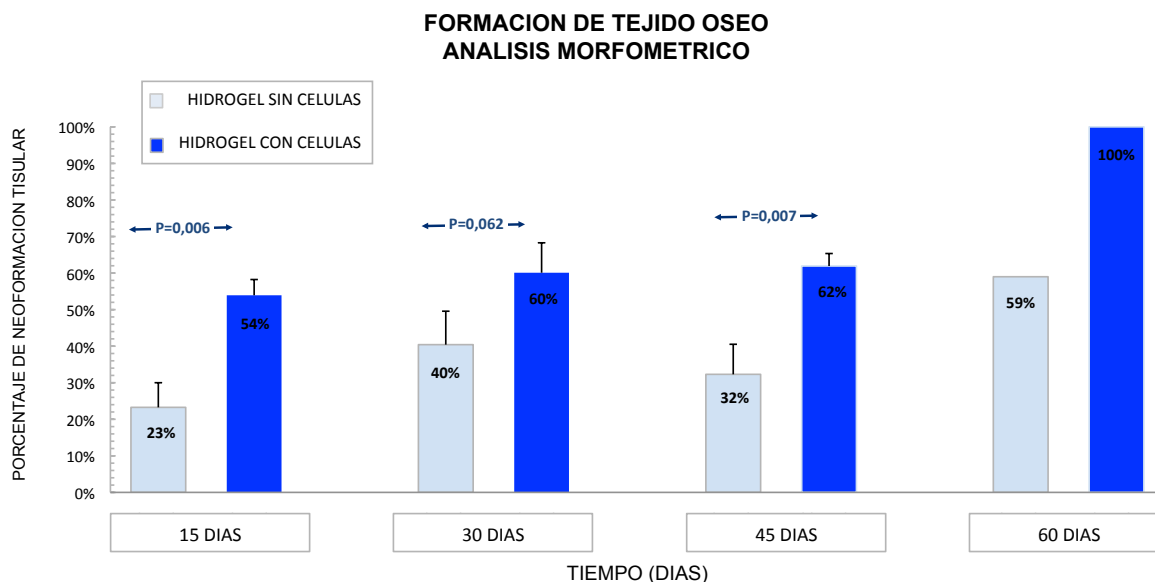


Figura 4.17 Evaluación de la formación de tejido óseo. Se midió porcentaje de regeneración de hueso Morfométricamente. Se graficó la Media \pm DS del porcentaje de hueso reconstruido a los 15, 30, 45 y 60 días, con o sin aplicación de Ad-MSc.

4.2.1.3. Análisis Histológico

Imágenes digitales representativas de cortes histológicos de los especímenes quirúrgicos injertados con hidrogeles con Ad-MSc y sus respectivos controles a los 15, 30, 45 y 60 días post cirugía, se muestran en las figuras 4.18 a 4.21.

En la **Figura 4.18** se observan los cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina a una magnificación de 40X, a los 15, 45 y 60 días.

En los paneles A y B en la zona de regeneración tisular se observa respuesta inflamatoria crónica moderada, tejido fibroconectivo con muchos fibroblastos entremezclados con tejido óseo inmaduro con osteoblastos en su interior. Los hallazgos histológicos son muy similares en las dos condiciones: con Ad-MSc y sin Ad-MSc. En los paneles C y D, se observa respuesta inflamatoria crónica moderada tanto en el lado tratado como en el lado control. En el lado donde se colocaron las Ad-MSc se observa que la disposición de las fibras colágenas es más organizada que en el lado donde se colocó el hidrogel sin células, lo que indica que el hueso neoformado es más maduro.

Además, se observa menor cantidad de tejido fibroconectivo entremezclado con el tejido óseo recién formado. En los paneles E y F, se observa respuesta inflamatoria crónica leve en las dos condiciones. En el lado tratado con las Ad-MSc, en el hueso neoformado se observa zonas de fibras colágenas que se disponen en láminas paralelas y bien organizadas, que corresponden al hueso ya maduro en donde se ven los osteocitos en sus lagunas. En el lado control se evidencia tejido fibroconectivo con muchos fibroblastos, la disposición de las fibras colágenas de manera desordenada (hueso plexi-

forme) lo que indica que es un hueso inmaduro y por lo tanto mas recientemente neoformado que el lado del hidrogel con células.

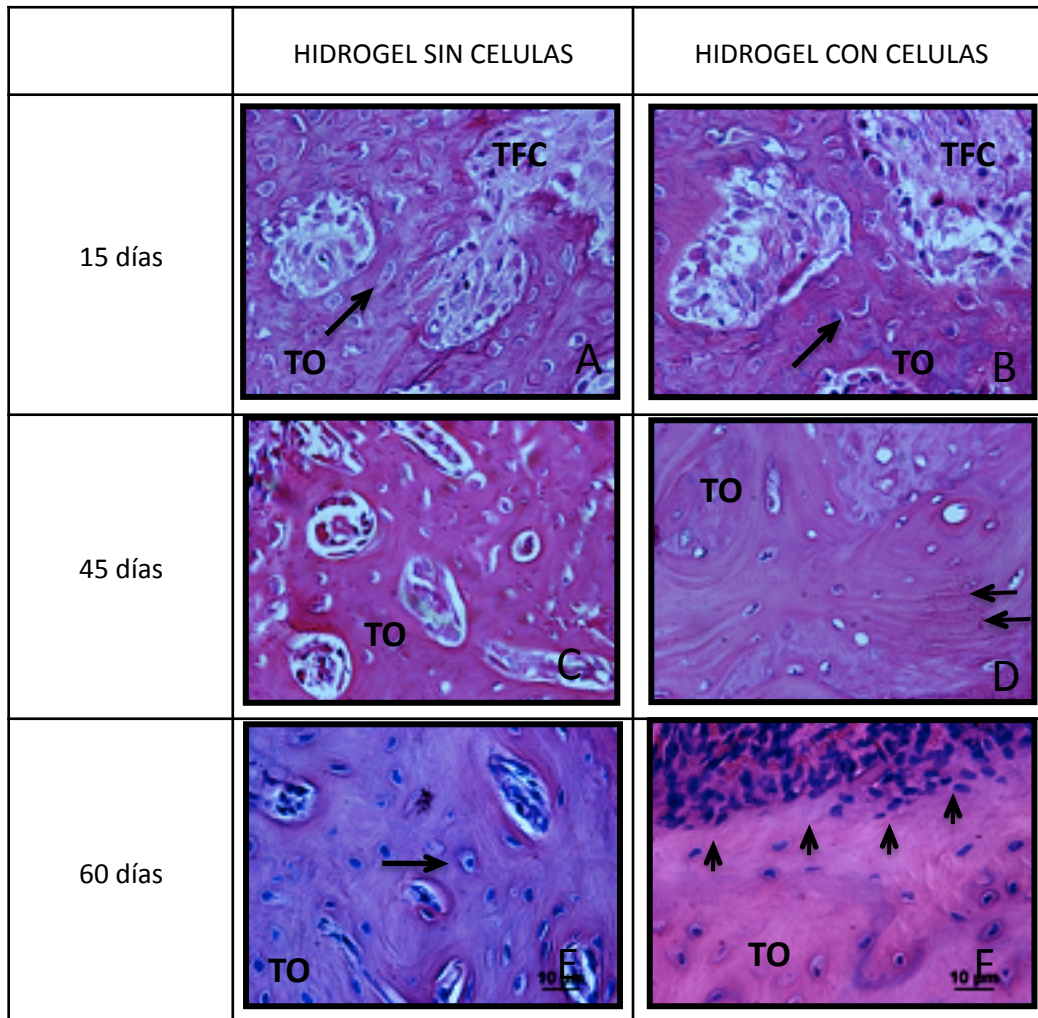


Figura 4.18 Comparación histológica de los defectos óseos injertados con hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC y sin Ad-MSC a los 15, 45 y 60 días. Tinción con hematoxilina eosina. Magnificación 40X. **A** y **B**, se observa tejido fibroconectivo con respuesta inflamatoria crónica moderada y tejido óseo inmaduro con osteoblastos en su interior (flecha). **C**, se observa tejido óseo inmaduro dispuesto de forma desordenada. **D**, se observan líneas de aposición ósea de manera organizada (flechas) en el tejido óseo inmaduro. **E**, tejido óseo inmaduro con osteocitos en su interior (flecha), **F**, tejido óseo maduro con empalizada osteoblástica en la parte superior (flechas). Convenciones: Tejido óseo (TO), Tejido Fibroconectivo (TFC).

En la **Figura 4.19** se observan los cortes histológicos teñidos con azul de toluidina a una magnificación de 40X a los 15, 45 y 60 días. El azul de toluidina es un colorante metacromático que toma una coloración rojiza cuando se expone a estructuras ricas en proteoglicanos sulfatados como el codroitín sulfato propio de la matriz cartilaginosa y una coloración azul oscura cuando se expone a estructuras basófilas como el hueso intramembranoso. En todos los pánels se puede observar en azul oscuro la disposición

del colágeno tipo I de la matriz ósea neoformada con osteoblastos en su interior. Es interesante que en todas las condiciones el proceso de osificación en este tejido, es principalmente intramembranoso (95%) con muy poca osificación endocondral (5%). Las principales diferencias se presentan en la disposición y organización de las fibras colágenas que en los lados tratados con Ad-MSK se alinean de una manera concéntrica formando la estructura típica del hueso maduro mientras que en los lados control esta disposición es mas desordenada e irregular.

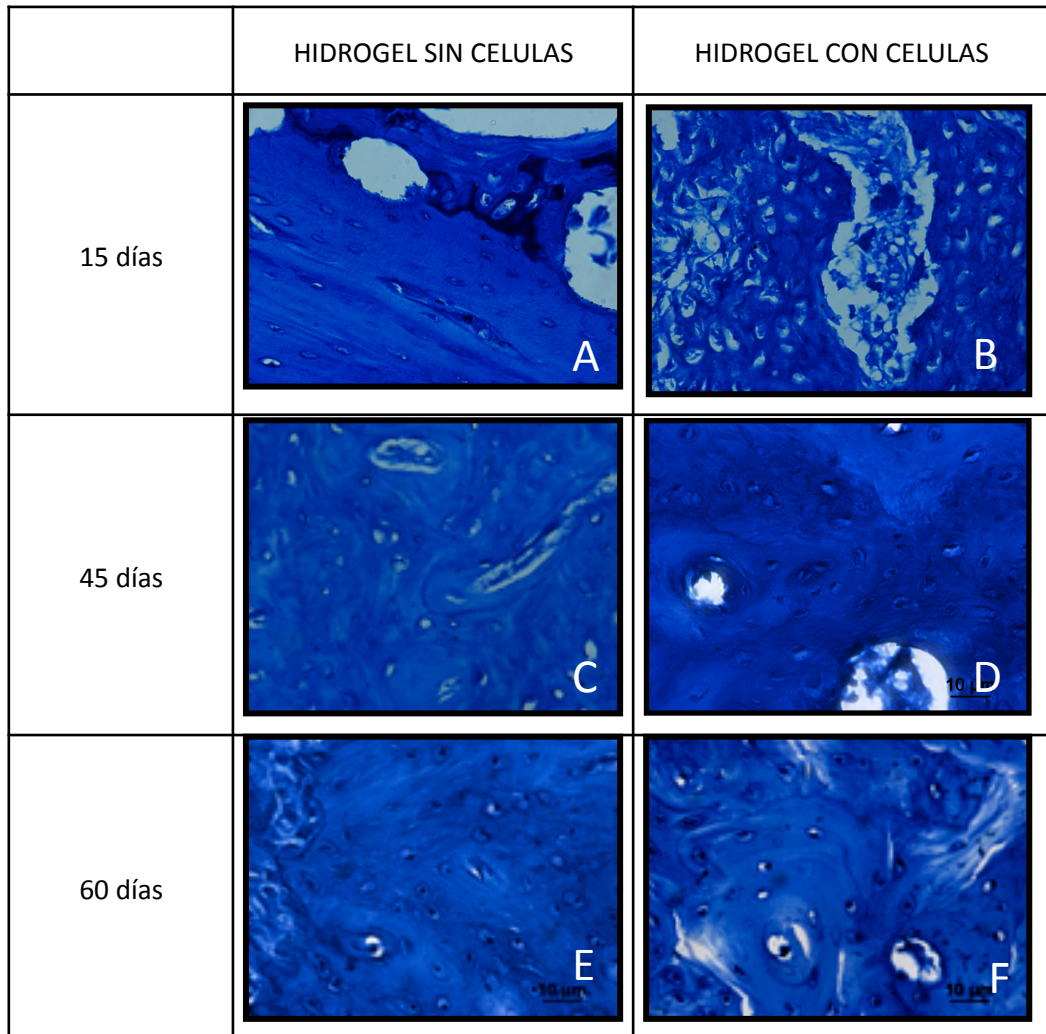


Figura 4.19 Comparación histológica de los defectos óseos injertados con hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSK y sin Ad-MSK a los 15, 45 y 60 días. Tinción con Azul de Toluidina. Magnificación 40X. En todos los paneles se evidencia que el principal tipo de osificación que se da en el proceso de regeneración ósea en todos los individuos es intramembranosa.

En la **Figura 4.20** se observan los cortes histológicos teñidos con Tricrómico de Masson a una magnificación de 10X a los 15, 45 y 60 días.

En todos los paneles se evidencia en azul fuerte el tejido óseo neoformado con los osteoblastos en el interior y con un tinte rojizo las zonas de matriz en proceso de calcificación. En el panel A se observa tejido fibroconectivo generalizado en color

magenta con pequeñas fibras de colágeno entremezcladas (azul claro). No se evidencian focos de calcificación. En el panel B, Se observa matriz colágena (azul claro) dispuesta entre núcleos de tejido fibroconectivo. En el panel C, se observa gran cantidad de tejido fibroconectivo dispuesto de una manera desorganizada con poca matriz mineralizada. En el panel D se evidencian fibras colágenas organizadas de manera concéntrica alrededor de los osteoblastos con pequeños indicios de zonas de mineralización. En los paneles E y F ya se observan más zonas de matriz mineralizada, sin embargo la disposición de esta matriz es más densa y ordenada en el lado donde se colocó el hidrogel con Ad-MSC que donde se implantaron los hidogeles sin células.

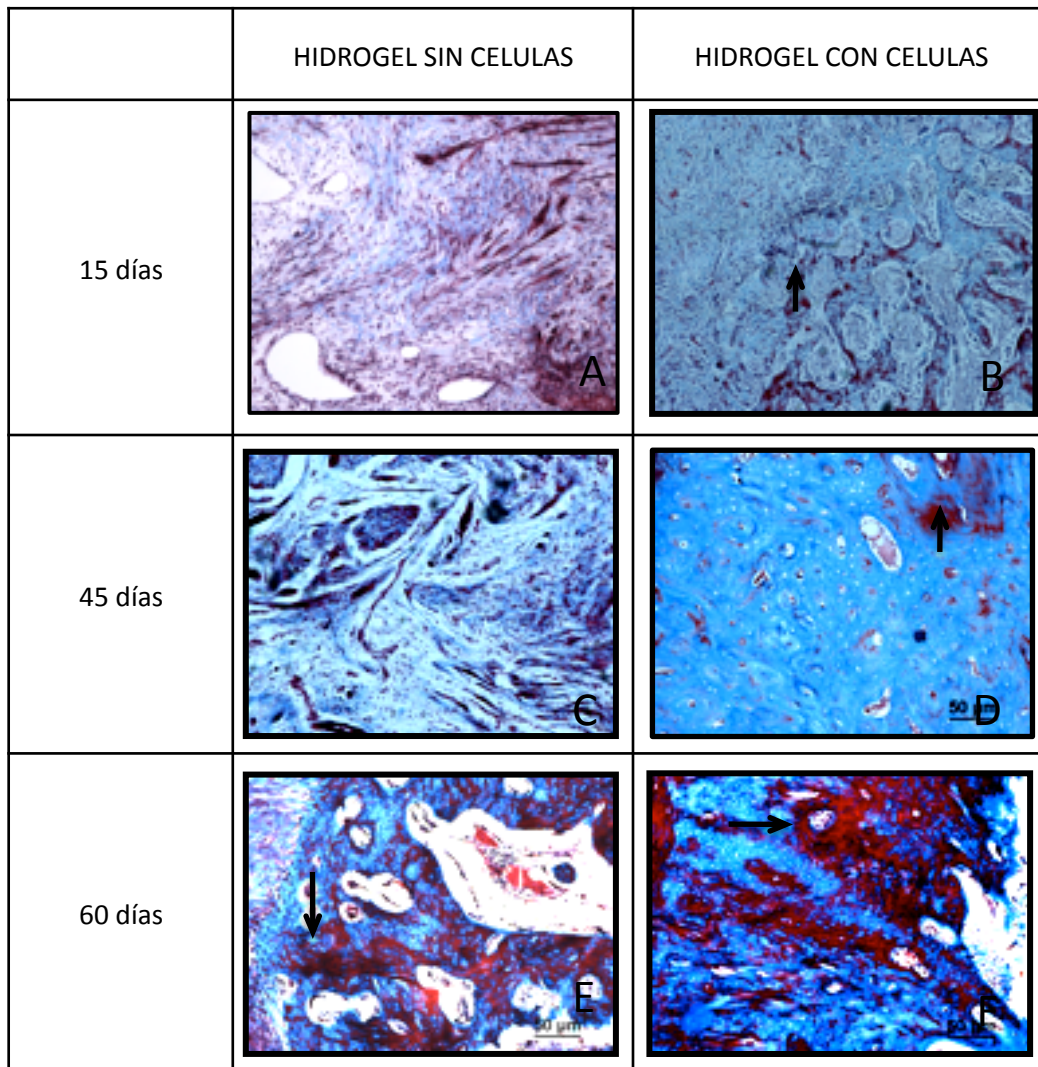


Figura 4.20 Comparación histológica de los defectos óseos injertados con hidrogel de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC y sin Ad-MSC a los 15, 45 y 60 días. Tinción con Azul de Toluidina, Magnificación 10X. **A**, tejido fibroconectivo generalizado en color magenta con pequeñas fibras de colágeno entremezcladas (azul claro) **B**, gran cantidad de tejido fibroconectivo con pequeños núcleos de formación ósea (flecha). **C**, tejido fibroconectivo generalizado, **D**, en azul claro se observa el hueso neoformado con pocos focos de mineralización que se evidencian como pequeñas zonas rojizas (flecha). **E**, tejido óseo neoformado con pequeños focos de osificación (flecha). **F**, tejido óseo inmaduro en azul claro y grandes zonas de calcificación en color rojizo (flecha).

En la **Figura 4.21** se muestran los cortes histológicos con las tinciones de hematoxilina-eosina, Azul de Toloudina y Tricrómico de Masson de los especímenes quirúrgicos del defecto óseo en el que se permitió el cierre por segunda intención 45 días después del procedimiento. En términos generales se observa tejido óseo inmaduro con gran cantidad de osteoblastos en su interior, organizado de forma laminar con zonas de calcificación ósea intercaladas con zonas de hueso inmaduro. El principal tipo de osificación es intramembranosa.

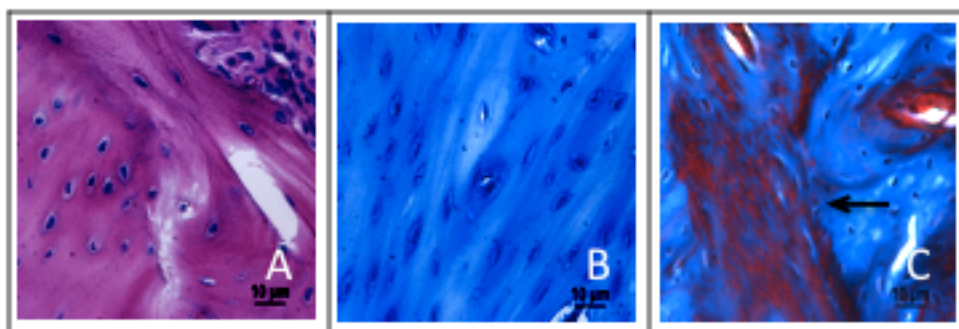


Figura 4.21 Regeneración ósea en el defecto óseo que cicatrizó por segunda intención. **A**, tinción con hematoxilina-eosina, se observa tejido óseo inmaduro con osteoblastos en su interior. **B**, tinción con azul de toluidina, se evidencia que la osificación es principalmente de tipo intramembranosa. **C**, tinción con tricrómico de Masson, en azul el hueso neoformado y en rojo focos de calcificación (flecha). Magnificación 40X.

En los resultados obtenidos en esta primera fase in vivo se encontraron diferencias importantes en el proceso de regeneración tisular en los defectos óseos mandibulares donde se implantó el hidrogel con células. Estas diferencias radican principalmente en la cantidad y la calidad del tejido óseo neoformado. Los hallazgos radiológicos y morfométricos permiten demostrar que el cierre de la herida quirúrgica por formación de tejido óseo nuevo dentro de la cavidad, es más rápido y efectivo con la aplicación de las MSCs. Además, los hallazgos histológicos sugieren que hay una distribución más organizada de la matriz colágena neoformada acelerando el proceso de maduración y calcificación de la matriz inorgánica depositada durante las primeras etapas de la regeneración. Por lo tanto, es evidente que las MSCs están ejerciendo un efecto positivo en el proceso de regeneración tisular en los defectos óseos, sin embargo, aún no es claro cuáles son los mecanismos de acción empleados para ejercer tal efecto, por esto, como una primera aproximación, se evaluó si las células humanas implantadas hacían parte del tejido neoformado.

4.2.2. Seguimiento de las Ad-MSC implantadas en defectos óseos mandibulares de conejos

Para detectar a las Ad-MSC en el sitio de aplicación, se emplearon 4 conejos en los que se implantaron hidrogeles de plasma sanguíneo humano con Ad-MSC y se sacrificaron a los 3, 6, 9 y 12 días después del tratamiento. La identificación de las células implantadas se hizo utilizando un anticuerpo primario específico para células humanas (Anti β -2 microglobulina humana).

A las muestras de los especímenes quirúrgicos se les realizó una inmunohistoquímica para detectar la β -2 microglobulina humana y así diferenciar las células humanas de las células del conejo en la zona del defecto óseo. Como control de la reacción se utilizaron especímenes quirúrgicos de piel humana. Como control positivo especímenes quirúrgicos de hueso humano y como control negativo especímenes quirúrgicos de hueso de conejo. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

En la **Figura 4.22**, en el panel A, se observa la inmunotinción positiva para la β -2 microglobulina humana en color café de células de dermis de una muestra de piel humana utilizada como control positivo de la reacción. En el panel B, se evidencian células con tinción positiva para la β -2 microglobulina humana en una muestra de tejido óseo humano utilizado como control positivo. En el panel C se muestra una tinción negativa sobre tejido óseo de conejo (control negativo). Durante los primeros días es muy clara la presencia de las MSCs humanas en las zona de regeneración tisular (Panel D). A medida que pasa el tiempo el número de células disminuye progresivamente (Panel E) hasta no encontrar evidencia de ninguna de ellas en el sitio de implantación ni en los tejidos adyacentes (Panel F).

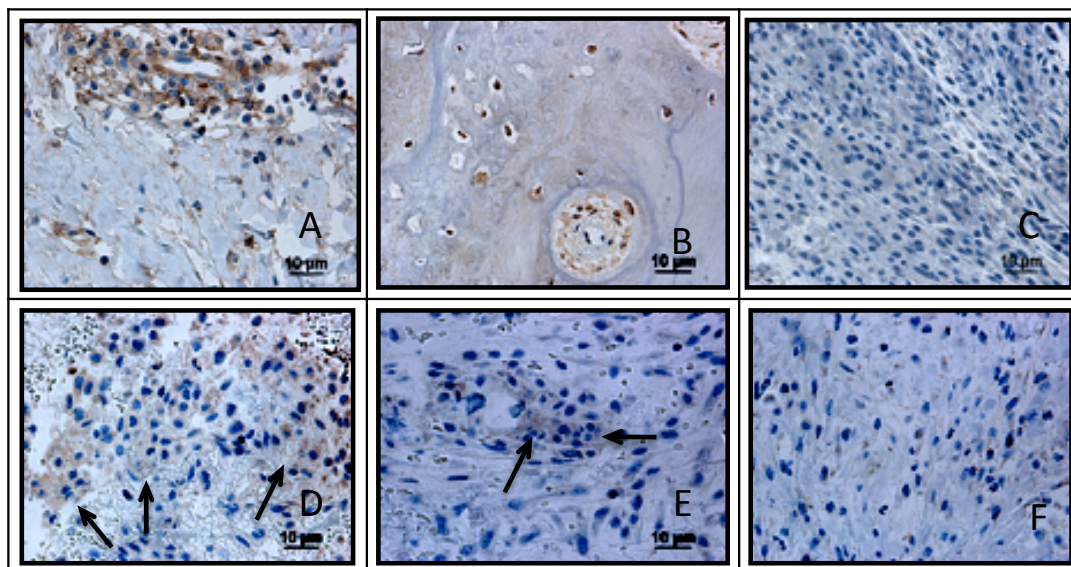


Figura 4.22 Detección por inmunohistoquímica de la β 2 microglobulina humana en la zona de regeneración tisular. **A**, control positivo de la reacción, piel humana. **B**, control positivo hueso humano. **C**, control negativo, hueso de conejo. **D**, zona de regeneración tisular a los 3 días de la implantación del hidrogel de plasma sanguíneo con Ad-MSC, inmunotinción positiva para la β -2 microglobulina humana

(flechas). **E**, zona de regeneración tisular a los 6 días de la implantación del hidrogel de plasma sanguíneo con Ad-MSC, (flechas). **F**, zona de regeneración tisular a los 12 días de la implantación del hidrogel de plasma sanguíneo con Ad-MSC. Magnificación 10X.

Los resultados obtenidos demuestran que las MSCs ejercen un efecto positivo en el proceso de regeneración ósea. Sin embargo, el hecho de que no se detecten las células después de 12 días de su aplicación, sugiere que el mecanismo de regeneración tisular no es precisamente por diferenciación de las células implantadas. Una posible explicación al proceso de regeneración es que las células ejerzan su actividad a través de un efecto paracrino, es decir, las MSCs son capaces de producir una serie de factores y citoquinas que inducen a las células del mismo individuo a una regeneración endógena. Para comprobar esta hipótesis se evaluó el proceso de regeneración ósea luego de la aplicación de medios condicionados en el mismo modelo animal.

4.2.3. Implantación de hidrogeles de plasma sanguíneo humano elaborados con Medios Condicionados en defectos óseos mandibulares de conejos

Para evaluar el efecto de los medios condicionados en el proceso de regeneración tisular en la zona del defecto óseo se emplearon 4 conejos. En tres de ellos se implantaron hidrogeles de plasma sanguíneo humano elaborados con MC obtenidos a partir de Ad-MSC utilizando dos concentraciones distintas de proteína total: 100 μ g/ml y 200 μ g/ml, en el mismo individuo. En un animal se implantó en un lado un hidrogel de plasma sanguíneo humano elaborado con MC (200 μ g/ml) y en el otro lado se permitió el cierre de la herida por segunda intención (control). El sacrificio de los animales se realizó 45 días después de el procedimiento quirúrgico.

4.2.3.1. Análisis Radiográfico

La **Figura 4.23** muestra imágenes representativas de los defectos óseos bilaterales a los 45 días después de haber implantado los hidrogeles de plasma sanguíneo humano con MC en diferentes concentraciones. En el defecto donde se permitió el cierre por segunda intención se observa un leve cambio no significativo en la densidad ósea predominando la radiolucidez en su interior. En el defecto donde se implantó el hidrogel con MC en una concentración de 100 μ g/ml se evidencia un puente óseo bien definido con una densidad ósea muy similar a la del hueso cortical circundante. En el defecto óseo donde se implantó el hidrogel con MC en una concentración de 200 μ g/ml se observa una zona radiopaca de menor densidad pero de mayor tamaño que la de la concentración de 100 μ g/ml que cubre casi la totalidad del defecto óseo inicial.

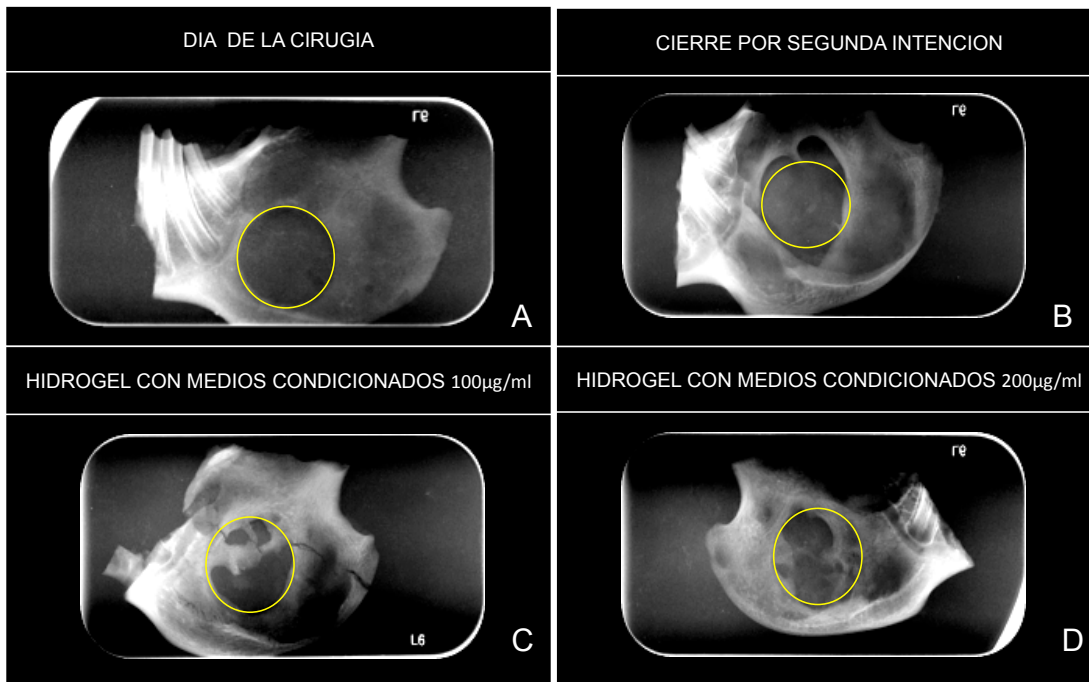


Figura 4.23 Comparación de imágenes radiográficas de defectos óseos con diferentes tratamientos con medios condicionados. **A**, tamaño inicial de la herida quirúrgica. **B**, cicatrización por segunda intención a los 45 días. **C**, defecto óseo tratado con hidrogel elaborado con medios condicionados a una concentración 100µg/ml a los 45 días. **D**, defecto óseo tratado con hidrogel elaborado con medios condicionados a una concentración 200µg/ml a los 45 días. El círculo amarillo representa el tamaño inicial del defecto óseo.

Area total de hueso neoformado: En las imágenes digitales tomadas en cada uno de los tratamientos realizados, se calculó el área del tejido óseo neoformado en mm^2 con ayuda del programa Image J 1.410 (National Institutes of Health, USA). El porcentaje de tejido óseo se calculó con la ecuación 3.1.

Se hizo un análisis descriptivo para comparar si existían diferencias significativas entre los tratamientos: concentración 100µg/ml y concentración 200µg/ml. Para establecer si las diferencias encontradas eran significativas, se utilizó la prueba estadística t Student. Se observa que con un 95% de confianza no hay diferencias significativas entre los dos grupos ($p=0,514$). **Figura 4.24.**

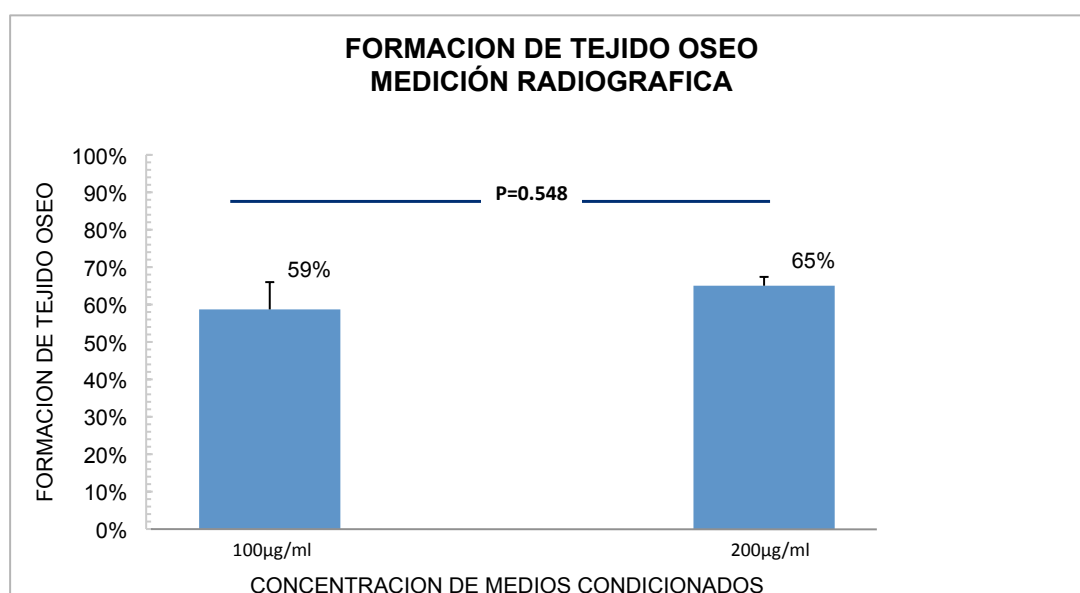


Figura 4.24 Evaluación radiográfica de la neoformación de tejido óseo. Evaluación radiográfica del porcentaje de tejido óseo neoformado a los 45 días después de haber implantado hidrogeles de plasma sanguíneo humano elaborados con MC con una concentración total de proteínas de 100µg/ml y 200µg/ml (n=4).

4.2.3.2. Análisis Morfométrico

La , muestra imágenes representativas de los especímenes quirúrgicos 45 días después de haber implantado los hidrogeles de plasma sanguíneo con medios condicionados en una concentración de 100µg/ml a un lado y de 200µg/ml al otro lado del mismo individuo. Se evidencia el cierre de las heridas quirúrgicas sin diferencias macroscópicas entre los dos tratamientos.

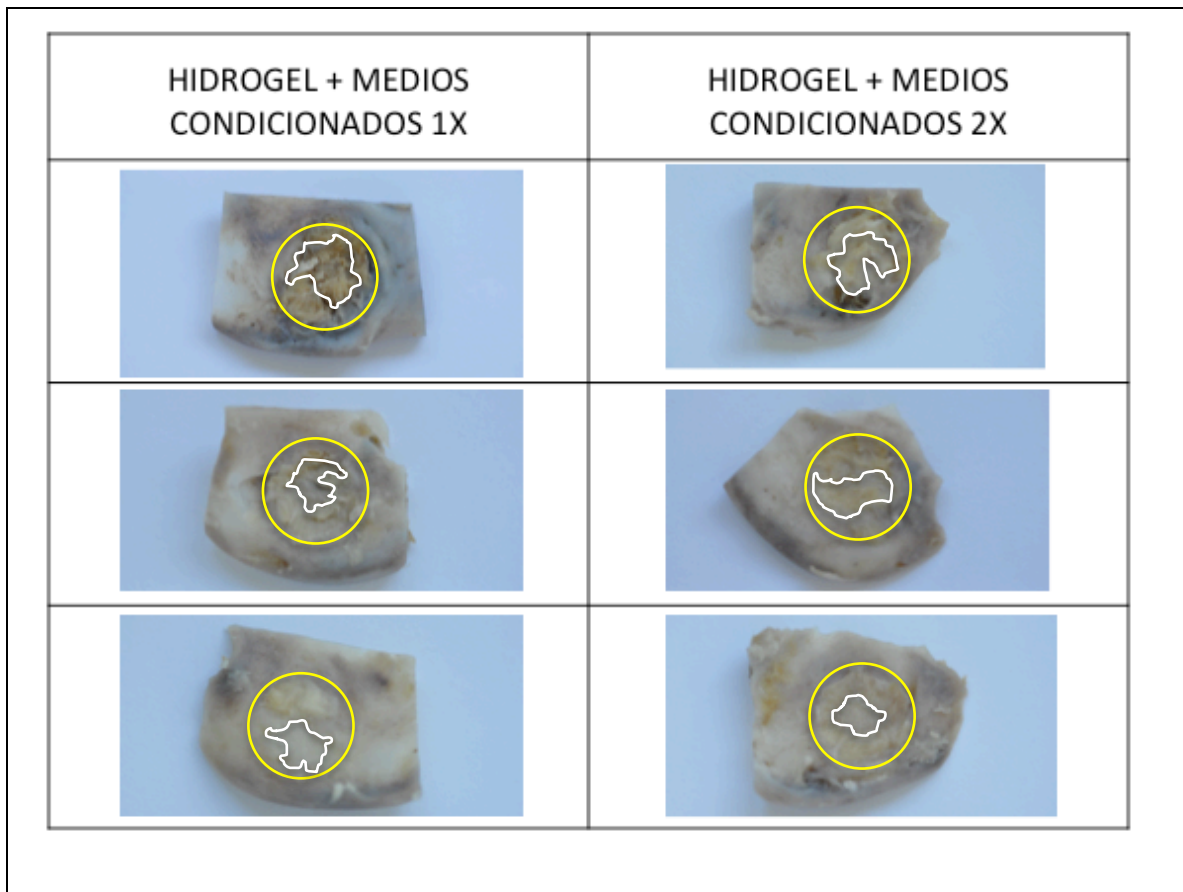


Figura 4.25 Especímenes quirúrgicos de la zona del defecto óseo. Imágenes representativas de los especímenes quirúrgicos 45 días después de haber implantado los hidrogeles de plasma sanguíneo con MC en una concentración de 100µg/ml y 200µg/ml.

Para establecer si las diferencias en el proceso de cicatrización encontradas entre los tratamientos eran significativas, se hizo un análisis descriptivo utilizando la prueba estadística t Student. Se observa que con un 95% de confianza no hay diferencias significativas entre los dos grupos ($p=0,958$). **Figura 4.26.**

4.2.3.3. Análisis Histológico

En la **Figura 4.27** se observan los cortes histológicos de los defectos óseos injertados con hidrogeles de plasma sanguíneo humano con MC, teñidos con hematoxilina eosina, azul de toluidina y tricrómico de Masson a una magnificación de 40X, 45 días después del implante.

En los cortes histológicos de la zona de regeneración del defecto óseo tratado con una concentración de MC de 100µg/ml no se observa ningún tipo de respuesta inflamatoria a los 45 días después del implante y osificación principalmente intramembranosa con gran cantidad de hueso inmaduro. Con una concentración mayor de medio condicionado, se observa inflamación crónica moderada, con una osificación principalmente intramembranosa y zonas de hueso laminar con intersticios de hueso plexiforme.

Morfométrica, radiográfica e histológicamente se evidencia un cierre de las heridas quirúrgicas en los defectos óseos mandibulares tratados con hidrogeles de plasma

sanguíneo humano con MC, tanto con una concentración de proteínas de 100µg/ml como con una concentración de 200µg/ml, lo que sugiere que no hay una relación directa entre la concentración de proteínas de los MC y la regeneración ósea. Al hacer el análisis comparativo del área de tejido óseo neoformado entre los individuos a quienes se les implantó los hidrogeles con MSCs y los hidrogeles con MC, se encontró mayor cierre de la herida quirúrgica en los defectos tratados con MC, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los hallazgos histológicos permiten demostrar que la calidad de tejido óseo formado, en cuanto a la disposición de fibras colágenas, estado de maduración y calcificación de la matriz inorgánica, es similar entre el grupo tratado con MSCs y el grupo tratado con MC.

El hecho de que las MSCs no sean detectadas en el tejido neoformado después de doce días de su implantación y que se dé el proceso de regeneración ósea al aplicar los MC en los defectos mandibulares sugiere que el mecanismo por el cual las MSCs ejercen su actividad regenerativa es a través de un efecto paracrino.

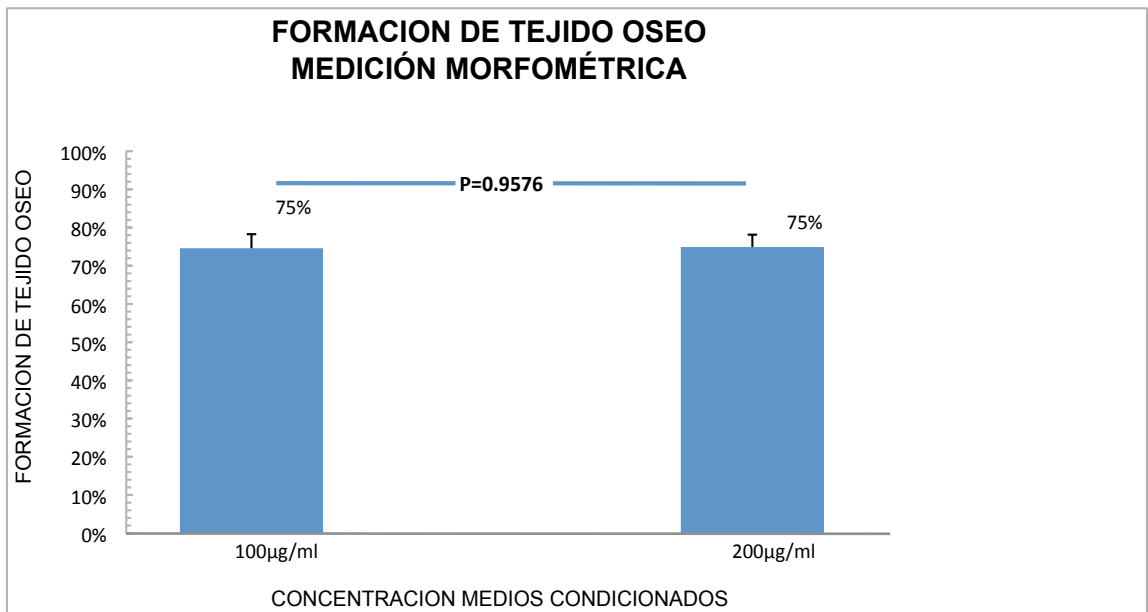


Figura 4.26 Evaluación de la formación de tejido óseo. Se midió morfométricamente el porcentaje de regeneración de hueso con los dos tratamientos MC-100µg/ml y MC-200µg/ml (n=4).

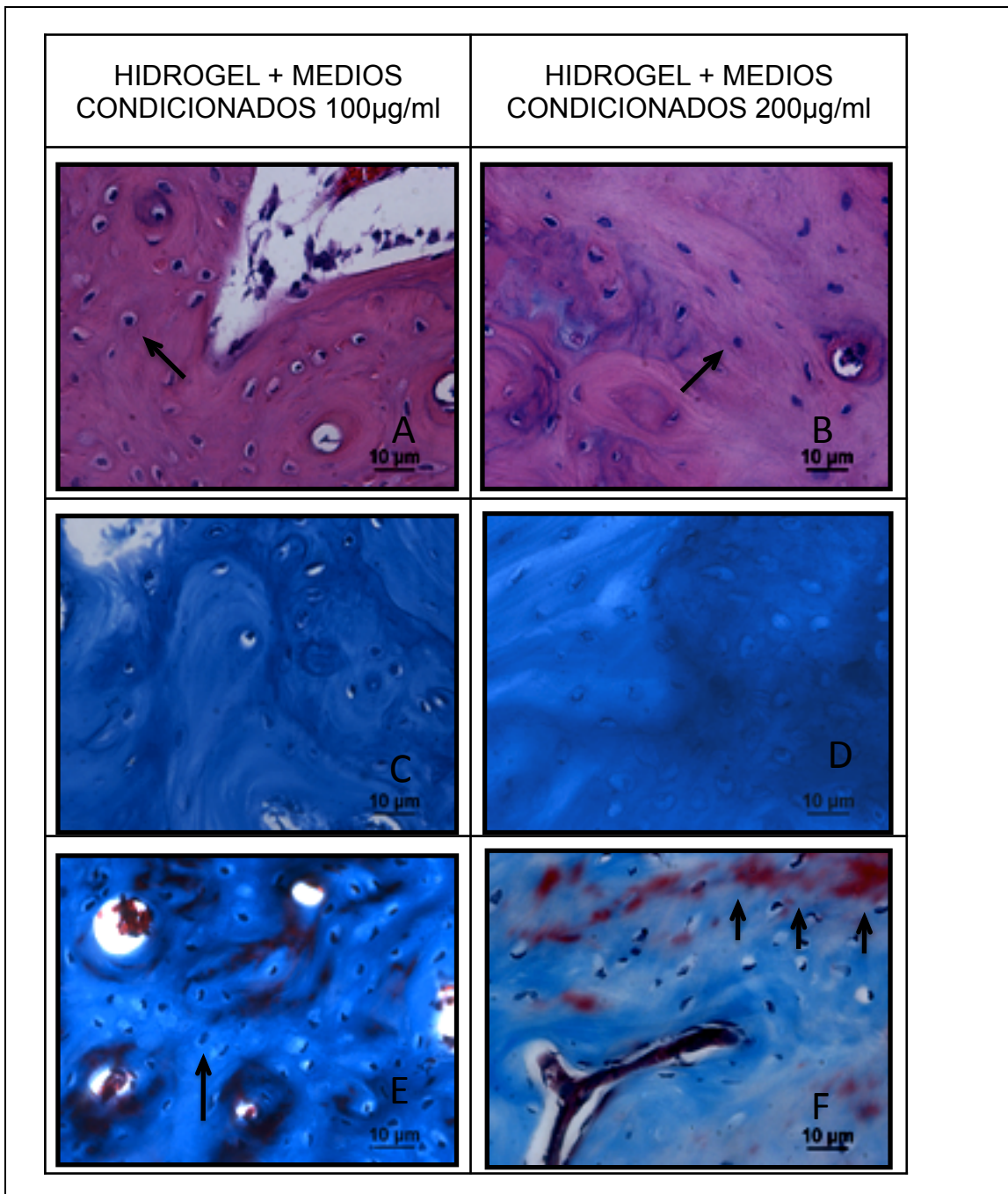


Figura 4.27 Comparación histológica de los defectos óseos de injertados con hidrogeles de plasma sanguíneo humano con medios condicionados en concentración 100µg/ml y 200µg/ml. **A y B**, tinción con hematoxilina eosina, se observan gran cantidad de osteocitos (flecha) en el interior de la matriz ósea neoformada **C y D**, con la tinción con azul de toluidina se evidencia que el tipo principal de osificación es endocondral. **E y F**, tinción con tricrómico de Masson. **E**, matriz ósea con osteocitos (flecha) en su interior. **F**, matriz ósea con focos de calcificación en rojizo (flechas). No se observan diferencias histológicas importantes entre los dos tratamientos. Magnificación 40X.

Capítulo 5

Discusión y Conclusiones

El quinto y último capítulo expone la discusión, que incluye las implicaciones y limitaciones del estudio, así como las principales conclusiones del mismo.

5.1. Discusión

Los defectos óseos, secuelas de enfermedades neoplásicas, infecciones, trauma e incluso los generados por un desarrollo esquelético anormal, son importantes causas de incapacidad estética y funcional. Su restauración continúa siendo un reto importante en el área de cirugía máxilofacial y ortopedia.

Los tratamientos actuales requieren de una o varias intervenciones quirúrgicas que involucran técnicas específicas como distracción osteogénica, implantación de biomateriales (sustitutos óseos) y trasplante de injertos óseos.

A pesar de los avances en la regeneración ósea y de la disponibilidad de gran cantidad de modalidades terapéuticas, la mayoría de los clínicos e investigadores continúan llegando a la misma conclusión: los injertos óseos autólogos siguen siendo el estándar de oro con respecto a otros procedimientos reconstructivos, al ser un material osteoprodutivo eficaz que facilita la regeneración ósea; proporciona una fuente de células osteogénicas, factores de crecimiento y de diferenciación. Los autoinjertos añaden, además, la posibilidad de aumento lateral simultáneo, menor costo y sin riesgo de transmisión de enfermedades. Sin embargo, tienen varias limitaciones importantes, como la disponibilidad de sitios competentes, la morbilidad del lugar donante, su escasez, su reabsorción, el aumento del tiempo quirúrgico, los costos y la logística de la intervención.

Para tratar de reducir esta problemática, surge la ingeniería de tejidos como una alternativa prometedora para la reconstrucción y regeneración del tejido óseo. La triada tradicional de la ingeniería de tejidos intenta replicar las propiedades intrínsecas del autoinjerto. Esta triada se compone de: transferencia suficiente de células osteocompetentes, un soporte estructurado que proporcione la osteoconducción y la aplicación de varios factores de crecimiento que puedan inducir osteogénesis a nivel mesenquimal. La venta-

ja importante de la ingeniería tisular sobre el injerto autógeno, es que el tejido óseo producido en un contexto ex vivo evita los inconvenientes de disponibilidad y morbilidad del autoinjerto. Los investigadores actuales continúan concentrándose en promover el modelo de ingeniería de tejidos como el “nuevo estado del arte” que consiste en lograr la reconstrucción ósea mediante la promoción osteogénica in situ. Este concepto puede llevarse a cabo a través de la entrega directa de células osteogénicas en el sitio del defecto con la ayuda de vehículos que contienen factores de crecimiento (Khojasteh et al., 2011).

Las MSCs por su capacidad de diferenciación a múltiples linajes, específicamente, por su potencialidad osteogénica y sus propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antiapoptóticas, se han convertido en la principal herramienta de la terapéutica celular para el tratamiento regenerativo de patologías que afectan funcionalmente al tejido óseo (Ankrum & Karp).

En este estudio confirmamos una vez más, que el tejido adiposo es una fuente importante de MSCs y su obtención a partir de él constituye un método fácil, de mínima morbilidad, con implicaciones éticas menores y que produce como resultado células que reúnen las características morfológicas, fenotípicas y de diferenciación de las células madre mesenquimales.

El aislamiento de las Ad-MSCs, se basó en la capacidad de adherencia al sustrato plástico de las cajas de cultivo celular. Se caracterizaron teniendo en cuenta los criterios morfológicos, fenotípicos y funcionales (Barry & Murphy, 2004; Kolf, Cho, & Tuan, 2007; Pittenger, Mosca, & McIntosh, 2000; Stewart & Stewart, 2011). Las células aisladas presentaron una forma fibroblastoide y mostraron ser positivas para los marcadores CD105, CD73, CD166 y CD44 y negativas para el marcador CD34 a través del análisis por RT-PCR. Datos muy similares a los obtenidos a través del análisis por citometría de flujo, en donde podemos observar un mayor porcentaje de células que expresan CD105, CD90 y HLA I y un menor porcentaje de células que no expresan CD34, CD45 y HLA II. Este perfil de expresión coincide con el perfil de marcadores de superficie celular descritos típicamente para MSCs en la literatura. (Ankrum & Karp, 2010; Barry & Murphy, 2004; Meirelles Lda et al., 2009; Pittenger et al., 1999; Stewart & Stewart, 2011).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran la capacidad de las Ad-MSCs de diferenciarse hacia el linaje osteogénico en condiciones de cultivo específicas.

Con el fin de crear un modelo para la aplicación clínica de las MSCs, utilizamos una matriz tridimensional de plasma sanguíneo humano que funciona como soporte osteoconductor para su mantenimiento y diferenciación osteogénica.

El hidrogel de plasma sanguíneo presenta las características físicas y biológicas necesarias para el cultivo de las Ad-MSCs, proporcionando una estabilidad superior a tres semanas, permitiendo la supervivencia y la proliferación celular. Además, se demostró que las Ad-MSCs conservan su capacidad de diferenciación hacia el linaje óseo en el interior del hidrogel. Sus características de supervivencia, proliferación y diferenciación osteogénica, fueron fundamentales para su utilización en el modelo experimental in vivo de defectos óseos mandibulares.

Los resultados de la fase in vivo demostraron que las MSCs promueven sustancialmente la formación de nuevo tejido óseo en los defectos mandibulares. Los hallazgos

morfométricos, radiográficos e histológicos permiten concluir que el cierre de los defectos óseos se da de manera más rápida y de mejor calidad cuando se implantan las MSCs. El tejido óseo neoformado presenta una disposición más organizada de las fibras colágenas, un mayor estado de maduración y de calcificación de la matriz inorgánica con osificación principalmente intramembranosa. En este punto, surge una pregunta: ¿ese hueso neoformado está constituido por las células humanas que se transplantaron?. Una posibilidad es que las MSCs implantadas hayan proliferado y se diferenciaron hacia el linaje osteogénico. Sin embargo, el hecho de que las células humanas no son detectables 12 días después del trasplante, sugiere que su acción regeneradora no se da por un proceso de proliferación y diferenciación.

Aunque los primeros conceptos sobre la aplicación de las MSCs se centraron en su capacidad de diferenciación multilínea y más específicamente sobre su potencial para diferenciarse en células osteogénicas que producen tejido óseo para el tratamiento de fracturas y algunas patologías como la osteogénesis imperfecta (Ankrum & Karp, 2010), los últimos ensayos clínicos se han centrado casi completamente en la capacidad de las MSCs para ejercer su función biológica a través de la secreción de citoquinas y factores de crecimiento que generan un efecto paracrino. Este cambio de paradigma surgió a partir de ensayos *in vivo* donde se observó una reducción de la inflamación, de la apoptosis y de la fibrosis, a pesar de la falta de diferenciación de las MSCs implantadas. Debido a que la supervivencia y la diferenciación de las células madre en el sitio de la lesión es limitada, se ha propuesto que la señalización paracrina es el mecanismo principal para sus efectos benéficos. Esta hipótesis es apoyada por investigaciones que reportan igualmente el aumento de reparación tisular con la aplicación de medios condicionados (MC) (Mirotsov, Jayawardena, Schmeckpeper, Gnechi, & Dzau, 2011; Timmers et al., 2011). Ensayos *in vitro* e *in vivo* demuestran que muchos tipos celulares responden o son sensibles a la señalización paracrina de las MSCs regulando un gran número de respuestas celulares, como supervivencia, proliferación, migración y expresión génica (Hocking & Gibran, 2010).

En esta investigación, los hallazgos morfométricos, radiográficos e histológicos permiten demostrar que la cantidad y calidad de tejido óseo formado, en cuanto a área, densidad ósea, disposición de fibras colágenas, estado de maduración y calcificación de la matriz inorgánica, es similar entre el grupo tratado con MSCs y el grupo tratado con MC. Por lo tanto, se produce el mismo fenómeno de regeneración ósea al implantar MSCs o al aplicar MC, confirmando el efecto paracrino que están ejerciendo las MSCs. Ese mismo efecto paracrino fue observado por Chen y colaboradores, cuando afirman que los MC de MSCs tienen un efecto similar a las MSCs en el proceso de reepitelización. Además los MC ejercen *in vivo* un efecto quimioatrayente para macrófagos, células endoteliales y queratinocitos epidérmicos, y pueden también regular la migración celular de fibroblastos, acelerando el cierre de las heridas al incrementar la producción de colágeno I por parte de los fibroblastos. Estos efectos se han evidenciado tanto con MC de MSCs de médula ósea como de tejido adiposo (Chen et al., 2008; Hocking & Gibran, 2010; Kim et al., 2006; O. K. Lee, 2008).

En nuestro grupo de investigación, en estudios previos al desarrollo de este trabajo, se demostró la presencia de diferentes factores proangiogénicos, citoquinas y otras biomoléculas de importancia biológica secretadas por las MSCs. En los MC obtenidos a

partir de Ad-MSCs en condiciones de hipoxia se detectaron 34 factores: VEGF, VEGF-D, VEGF-R2, bFGF, Ang-2, Tie-2, Trombopoyetina, Angiostatina, Endostatina angiogenina, IL-6, IL-8, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IFN γ , Quimocinas (ENA-78, GRO, MMP1, RANTES), TIMP-1, TIMP-2, EGF, IGF-1, LEPTIN, PDGF-BB, PIGF, TGF β , u-PAR, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, I-309, I-TAC, Ang-1, IL-10, IL-2, MCP-3, MCP-4, MMP-9, PECAM, TNF α y VEGF-R3 (Restrepo, 2009).

También en nuestro grupo se demostraron las propiedades angiogénicas de los MC en ensayos in vitro (Doncel A, 2010) y la efectividad que ellos tienen para la reparación de heridas (Sanchez Rafael 2011) y la reparación medular en modelos animales (Nuñez Diana Leandra, 2011).

Es evidente que la terapia con MSCs mejora el proceso de regeneración ósea, lo cual se puede atribuir principalmente a la liberación de factores paracrinos que median mecanismos de supervivencia y proliferación celular, neovascularización, remodelación y regeneración.

El demostrar que las MSCs segregan factores terapéuticos representa un gran avance potencial en la medicina regenerativa. La caracterización de los factores paracrinos puede sustituir la terapia basada en células por la terapia basada en factores solubles, pues es una manera más fácil de acercarse a la clínica. Las MSCs son entonces prometedoras herramientas para el tratamiento de diferentes tipos de patologías, debido a que secretan una amplia variedad de moléculas bioactivas que finalmente conducen a la formación tisular en el sitio de la lesión. En muchos casos, el tiempo requerido para aislar y expandir el cultivo de células madre no permite la aplicación autóloga inmediata de las células. El uso terapéutico de los MC, evita los cuestionamientos y dificultades de los trasplantes celulares. Su almacenamiento y transporte es menos complejo que el de las células; además, los MC son más fáciles de manipular y controlar por parte del médico durante un procedimiento terapéutico. El número de moléculas conocidas que median la acción paracrina de las MSCs se incrementa cada día, y esto aumenta significativamente su rango de aplicaciones terapéuticas. A pesar de las ventajas que tiene el utilizar los MC, no necesariamente indica que ellos puedan reemplazar el uso de las células. Es posible que en algunos tipos de patologías sea más conveniente utilizar las células que los medios.

Los resultados de este trabajo sustentan y refuerzan la posibilidad de desarrollar una nueva estrategia terapéutica para la aplicación de MSCs y de MC en el tratamiento de ciertas alteraciones óseas, reduciendo cada vez más la brecha entre las ciencias básicas y la medicina reconstructiva en la práctica clínica. El hidrogel de plasma sanguíneo humano proporciona un sustrato autólogo, totalmente biocompatible, biodegradable, hemostático, de fácil manejo, potencialmente inyectable y económico. Las MSCs mejoran el proceso de regeneración ósea, principalmente por la liberación de sus factores paracrinos, que al ser recolectados y aplicados como medios condicionados, producen el mismo efecto en la regeneración tisular que ellas mismas. Esto podría ser un avance significativo en el sector salud de nuestro país, pues disminuiría los costos de tratamientos y el tiempo de recuperación en determinadas situaciones clínicas, que finalmente se reflejaría en un mejoramiento del sistema de salud colombiano.

5.2. Conclusiones

1. El tejido adiposo es una fuente importante de MSCs y su obtención a partir de él constituye un método fácil, de mínima morbilidad, con implicaciones éticas menores y que produce como resultado células que reúnen las características morfológicas, fenotípicas y de diferenciación que definen a las células madre mesenquimales.

3. El hidrogel de plasma sanguíneo proporciona un sistema para el trasplante de las MSCs permitiendo la supervivencia y proliferación celular. Además, se demostró que las Ad- MSC conservan su capacidad de diferenciación hacia el linaje óseo en el interior del hidrogel.

4. El hidrogel de plasma sanguíneo humano proporciona un sustrato autólogo totalmente biocompatible, reabsorbible, biodegradable, hemostático, de fácil manejo, potencialmente inyectable y económico en el que las células madre mesenquimales proliferan, se diferencian y cumplen su papel de regeneración y reparación del tejido óseo.

5. Este sistema de implantación celular no solamente se limita al tratamiento de lesiones óseas sino que puede ser aplicable también otros tipos de lesiones como por ejemplo para heridas en piel.

6. Los resultados de este trabajo concluyen que las Ad-MSCs mejoran el proceso de regeneración ósea, lo cual se le atribuye principalmente a la liberación de factores paracrinos que median mecanismos de remodelación y regeneración tisular y no por proliferación y diferenciación de las células implantadas.

7. Estos resultados demuestran que el implante de Ad-MSCs o la aplicación de MC mejora sustancialmente el proceso de regeneración tisular en defectos

8. Los resultados apoyan la posibilidad de desarrollar una estrategia terapéutica utilizando los medios condicionados y no necesariamente las células con las grandes ventajas que ello representa.

Bibliografía

Alam, S., Ueki, K., Marukawa, K., Ohara, T., Hase, T., Takazakura, D., et al. (2007). Expression of bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 during bone regeneration using different implant materials as an onlay bone graft in rabbit mandibles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 103(1), 16-26.

Alliston, T., & Derynck, R. (2002). Medicine: interfering with bone remodelling. *Nature*, 416(6882), 686-687.

Ankrum, J., & Karp, J. M. (2010). Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med*, 16(5), 203-209.

Asahara, T., & Kawamoto, A. (2004). Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(3), C572-579.

AVMA, A. V. M. A. (2007). Guidelines on Euthanasia Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association.

Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(4), 568-584.

Bartold, P. M., McCulloch, C. A., Narayanan, A. S., & Pitaru, S. (2000). Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol 2000*, 24, 253-269.

Behnia, H., Khojasteh, A., Soleimani, M., Tehrani, A., & Atashi, A. (2011). Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg*, 40(1), 2-7.

Beltran, O. (2007). Expresión de factores angiogénicos en células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo, en condiciones de normoxia e hipoxia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Beltran O, R. S., Chaparro O. (2009). Comparison of gene expression and secretion of a group of angiogenic factors in Human Mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Abstract 1538 ISSCR 7th annual meeting* p247.

Ben-David, D., Kizhner, T. A., Kohler, T., Muller, R., Livne, E., & Srouji, S. (2011). Cell-scaffold transplant of hydrogel seeded with rat bone marrow progenitors for bone regeneration. *J Craniomaxillofac Surg*, 39(5), 364-371.

Bensaid, W., Triffitt, J. T., Blanchat, C., Oudina, K., Sedel, L., & Petite, H. (2003). A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*, 24(14), 2497-2502.

Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342.

Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., & Nohe, A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal*, 23(4), 609-620.

Burastero, G., Scarfi, S., Ferraris, C., Fresia, C., Sessarego, N., Fruscione, F., et al. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. *Bone*, 47(1), 117-126.

Cancedda, R., Giannoni, P., & Mastrogiacomo, M. (2007). A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*, 28(29), 4240-4250.

Carstens, M. H., Chin, M., & Li, X. J. (2005). In situ osteogenesis: regeneration of 10-cm mandibular defect in porcine model using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and Helistat absorbable collagen sponge. *J Craniofac Surg*, 16(6), 1033-1042.

Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25(11), 2739-2749.

Chen, L., Tredget, E. E., Wu, P. Y., & Wu, Y. (2008). Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*, 3(4), e1886.

Chevallier, N., Anagnostou, F., Zilber, S., Bodivit, G., Maurin, S., Barrault, A., et al. (2010). Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials*, 31(2), 270-278.

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 1(2), 581-585.

Clarke, D., & Frisen, J. (2001). Differentiation potential of adult stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 11(5), 575-580.

Cui, L., Liu, B., Liu, G., Zhang, W., Cen, L., Sun, J., et al. (2007). Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials*, 28(36), 5477-5486.

Degano, I. R., Vilalta, M., Bago, J. R., Matthies, A. M., Hubbell, J. A., Dimitriou, H., et al. (2008). Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 29(4), 427-437.

Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., et al. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838-3843.

Dicker, A., Le Blanc, K., Astrom, G., van Harmelen, V., Gotherstrom, C., Blomqvist, L., et al. (2005). Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res*, 308(2), 283-290.

Doncel A, C. O. (2010). Comparación in vitro del efectoangiogénico de medios condicionados de células madre mesenquimales humanas obtenidas a partir de tejido adiposo y medula ósea cultivadas en normoxia e hipoxia. Universidad Nacional de Colombia.

Donzelli, E., Salvade, A., Mimo, P., Vigano, M., Morrone, M., Papagna, R., et al. (2007). Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Arch Oral Biol*, 52(1), 64-73.

Duque, A., Estupiñan, B., & P., H. (2002). Labio y paladar fisurados en niños menores de 14 años. *Colombia Médica*, 33(3), 108 - 112.

Eyrich, D., Brandl, F., Appel, B., Wiese, H., Maier, G., Wenzel, M., et al. (2007). Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials*, 28(1), 55-65.

Ferrer Cañabate J, T. I., Martínez P. . (2002). Osteoprotegerina y Sistema RANKL/RANK: ¿el futuro del metabolismo óseo? *An Med Interna*, 19(8), 385-388.

Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., & Gerasimov, U. V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*, 20(3), 263-272.

Giannoudis, P. V., Einhorn, T. A., Schmidmaier, G., & Marsh, D. (2008). The diamond concept--open questions. *Injury*, 39 Suppl 2, S5-8.

Gorodetsky, R., Clark, R. A., An, J., Gailit, J., Levdansky, L., Vexler, A., et al. (1999). Fibrin microbeads (FMB) as biodegradable carriers for culturing cells and for accelerating wound healing. *J Invest Dermatol*, 112(6), 866-872.

Gurevich, O., Vexler, A., Marx, G., Prigozhina, T., Levdansky, L., Slavin, S., et al. (2002). Fibrin microbeads for isolating and growing bone marrow-derived progenitor cells capable of forming bone tissue. *Tissue Eng*, 8(4), 661-672.

Heath, C. A. (2000). Cells for tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 18(1), 17-19.

Heliotis, M., Ripamonti, U., Ferretti, C., Kerawala, C., Mantalaris, A., & Tsiridis, E. (2009). The basic science of bone induction. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 47(7), 511-514.

Hibi, H., Yamada, Y., Ueda, M., & Endo, Y. (2006). Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35(6), 551-555.

Hobeika, M. J., Edlin, R. S., Muhs, B. E., Sadek, M., & Gagne, P. J. (2008). Matrix metalloproteinases in critical limb ischemia. *J Surg Res*, 149(1), 148-154.

Hocking, A. M., & Gibran, N. S. (2010). Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*, 316(14), 2213-2219.

Hoemann, C. D., El-Gabalawy, H., & McKee, M. D. (2009). In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris)*, 57(4), 318-323.

Hoogduijn, M. J., Popp, F., Verbeek, R., Masoodi, M., Nicolaou, A., Baan, C., et al. (2010). The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol*, 10(12), 1496-1500.

Hsiong, S. X., & Mooney, D. J. (2006). Regeneration of vascularized bone. *Periodontol 2000*, 41, 109-122.

Huang, Z., Ren, P. G., Ma, T., Smith, R. L., & Goodman, S. B. (2010). Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. *Cytokine*, 51(3), 305-310.

Im, G.-I. (2005). Chondrogenesis from mesenchymal stem cells derived adipose tissue of fibrin scaffold. *Current Applied Physics*, 5, 438-443.

Isaacson, G., & Herman, J. H. (1996). Autologous plasma fibrin glue: rapid preparation and selective use. *Am J Otolaryngol*, 17(2), 92-94.

Ishikawa, I., Iwata, T., Washio, K., Okano, T., Nagasawa, T., Iwasaki, K., et al. (2009). Cell sheet engineering and other novel cell-based approaches to periodontal regeneration. *Periodontol 2000*, 51, 220-238.

Jiang, X., Gittens, S. A., Chang, Q., Zhang, X., Chen, C., & Zhang, Z. (2006). The use of tissue-engineered bone with human bone morphogenetic protein-4-modified bo-

ne-marrow stromal cells in repairing mandibular defects in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35(12), 1133-1139.

Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., & Verfaillie, C. M. (2002). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*, 30(8), 896-904.

Kanczler, J. M., Ginty, P. J., Barry, J. J., Clarke, N. M., Howdle, S. M., Shakesheff, K. M., et al. (2008). The effect of mesenchymal populations and vascular endothelial growth factor delivered from biodegradable polymer scaffolds on bone formation. *Biomaterials*, 29(12), 1892-1900.

Kawanabe, N., Murata, S., Murakami, K., Ishihara, Y., Hayano, S., Kurosaka, H., et al. Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. *Differentiation*, 79(2), 74-83.

Kazakos, K., Lyras, D. N., Thomaidis, V., Agrogiannis, G., Botaitis, S., Drosos, G., et al. Application of PRP gel alone or in combination with guided bone regeneration does not enhance bone healing process: An experimental study in rabbits. *J Cranio-maxillofac Surg*, 39(1), 49-53.

Keramaris, N. C., Calori, G. M., Nikolaou, V. S., Schemitsch, E. H., & Giannoudis, P. V. (2008). Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*, 39 Suppl 2, S45-57.

Khojasteh, A., Behnia, H., Dashti, S. G., & Stevens, M. (2011). Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*, 70(4), 972-982.

Kim, D. I., Kim, M. J., Joh, J. H., Shin, S. W., Do, Y. S., Moon, J. Y., et al. (2006). Angiogenesis facilitated by autologous whole bone marrow stem cell transplantation for Buerger's disease. *Stem Cells*, 24(5), 1194-1200.

Kloss, F. R., Tuli, T., Hachl, O., Laimer, K., Jank, S., Stempf, K., et al. (2007). The impact of ageing on cranio-maxillofacial trauma-a comparative investigation. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 36(12), 1158-1163.

Kolf, C. M., Cho, E., & Tuan, R. S. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*, 9(1), 204.

Kramer, F. J., Baethge, C., Sinikovic, B., & Schliephake, H. (2007). An analysis of quality of life in 130 families having small children with cleft lip/palate using the impact on family scale. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 36(12), 1146-1152.

Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., et al. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101(9), 3722-3729.

Kuen Yong Lee, S. H. Y. (2007). Polymeric protein delivery systems. *Prog. Polym. Sci*, 32, 669-697.

Lane, J. M., Tomin, E., & Bostrom, M. P. (1999). Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res*(367 Suppl), S107-117.

Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920-926.

Lee, J., Sung, H. M., Jang, J. D., Park, Y. W., Min, S. K., & Kim, E. C. (2010). Successful reconstruction of 15-cm segmental defects by bone marrow stem cells and resec-

ted autogenous bone graft in central hemangioma. *J Oral Maxillofac Surg*, 68(1), 188-194.

Lee, L. T., Kwan, P. C., Chen, Y. F., & Wong, Y. K. (2008). 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*, 71(2), 66-73.

Lee, O. K. (2008). Fibrin glue as a vehicle for mesenchymal stem cell delivery in bone regeneration. *J Chin Med Assoc*, 71(2), 59-61.

Lee, R. H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H. S., Suh, K., et al. (2004). Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*, 14(4-6), 311-324.

Lee, S. H., & Shin, H. (2007). Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 59(4-5), 339-359.

Levi, B., & Longaker, M. T. (2010). Osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells in mouse and human: in vitro and in vivo methods. *J Craniofac Surg*, 22(2), 388-391.

Levi, B., Nelson, E. R., Brown, K., James, A. W., Xu, D., Dunlevie, R., et al. (2010). Differences in osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells from murine, canine, and human sources in vitro and in vivo. *Plast Reconstr Surg*, 128(2), 373-386.

Li, H., Dai, K., Tang, T., Zhang, X., Yan, M., & Lou, J. (2007). Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 356(4), 836-842.

Lin, C. Y., Chang, Y. H., Lin, K. J., Yen, T. C., Tai, C. L., Chen, C. Y., et al. (2010). The healing of critical-sized femoral segmental bone defects in rabbits using baculovirus-engineered mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 31(12), 3222-3230.

Lin, N. H., Gronthos, S., & Mark Bartold, P. (2009). Stem cells and future periodontal regeneration. *Periodontol 2000*, 51, 239-251.

Lind, M. (1996). Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand*, 67(4), 407-417.

Lind, M. (1998). Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl*, 283, 2-37.

Linnes, M. P., Ratner, B. D., & Giachelli, C. M. (2007). A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*, 28(35), 5298-5306.

Liu, Y., Zhou, Y., Feng, H., Ma, G. E., & Ni, Y. (2008). Injectable tissue-engineered bone composed of human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials*, 29(23), 3338-3345.

Lowe, J. (1998). www.nottingham.ac.uk/pathology/protocols/alkphos.html.

Lung, T., Tascau, O. C., Almasan, H. A., & Muresan, O. (2007). Head and neck cancer, epidemiology and histological aspects - Part 1: a decade's results 1993-2002. *J Craniomaxillofac Surg*, 35(2), 120-125.

Magdalenic-Mestrovic, M., & Bagatin, M. (2005). An epidemiological study of orofacial clefts in Croatia 1988-1998. *J Craniomaxillofac Surg*, 33(2), 85-90.

Martinet, L., Fleury-Cappellesso, S., Gadelorge, M., Dietrich, G., Bourin, P., Fournie, J. J., et al. (2009). A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*, 39(3), 752-762.

Mazlyzam, A. L., Aminuddin, B. S., Fuzina, N. H., Norhayati, M. M., Fauziah, O., Isa, M. R., et al. (2007). Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns*, 33(3), 355-363.

McKay, W. F., Peckham, S. M., & Badura, J. M. (2007). A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop*, 31(6), 729-734.

Meijer, G. J., de Bruijn, J. D., Koole, R., & van Blitterswijk, C. A. (2008). Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials*, 29(21), 3053-3061.

Meinel, L., Hofmann, S., Betz, O., Fajardo, R., Merkle, H. P., Langer, R., et al. (2006). Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2. *Biomaterials*, 27(28), 4993-5002.

Meirelles Lda, S., Fontes, A. M., Covas, D. T., & Caplan, A. I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20(5-6), 419-427.

Mendoza Jose J., L. P. J. (2010). Regenerative Facial Reconstruction Terminal Stage Osteoradionecrosis and Other Advanced Craniofacial Diseases with Adult Cultured Stem and Progenitor Cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 126(5), 1699-1709.

Merchant, A. M., & Flake, A. W. (2004). Surgeons and stem cells: a pragmatic perspective on shifting paradigms. *Surgery*, 136(5), 975-980.

Mesimaki, K., Lindroos, B., Tornwall, J., Mauno, J., Lindqvist, C., Kontio, R., et al. (2009). Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 38(3), 201-209.

Miloro, M., Haralson, D. J., & Desa, V. (2010). Bone healing in a rabbit mandibular defect using platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg*, 68(6), 1225-1230.

Mirotsov, M., Jayawardena, T. M., Schmeckpeper, J., Gneccchi, M., & Dzau, V. J. (2011). Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 50(2), 280-289.

Mitrano, T. I., Grob, M. S., Carrion, F., Nova-Lamperti, E., Luz, P. A., Fierro, F. S., et al. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *J Periodontol*, 81(6), 917-925.

Mladina, R., Skitarelic, N., Vukovic, K., Subaric, M., Caric, T., & Orihovac, Z. (2008). Unilateral cleft lip/palate children: the incidence of type 6 septal deformities in their parents. *J Craniomaxillofac Surg*, 36(6), 335-340.

Mol, A., van Lieshout, M. I., Dam-de Veen, C. G., Neuenschwander, S., Hoerstrup, S. P., Baaijens, F. P., et al. (2005). Fibrin as a cell carrier in cardiovascular tissue engineering applications. *Biomaterials*, 26(16), 3113-3121.

Mori, M., a, b., , M. M., a, , T. N., b, et al. (2010). Biological implications of growth factors in bone remodeling following fracture, surgical resection and bonegrafting. Part 1: Transforming growth factors, bone morphogenetic proteins and related factors. *Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 22 117-125.

Nagao, H., Tachikawa, N., Miki, T., Oda, M., Mori, M., Takahashi, K., et al. (2002). Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in alveolar ridge defects in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 31(1), 66-72.

NAP, N. A. P. (1996). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington D.C.: Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council.

Niemeyer, P., Fechner, K., Milz, S., Richter, W., Suedkamp, N. P., Mehlhorn, A. T., et al. (2010). Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*, 31(13), 3572-3579.

Núñez Diana Leandra, O. C. (2011). Evaluación del efecto de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y de medios condicionados en la recuperación motora de ratas con lesión medular. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Osathanon, T., Linnes, M. L., Rajachar, R. M., Ratner, B. D., Somerman, M. J., & Giachelli, C. M. (2008). Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 29(30), 4091-4099.

Parekkadan, B., van Poll, D., Megeed, Z., Kobayashi, N., Tilles, A. W., Berthiaume, F., et al. (2007). Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 363(2), 247-252.

Park, K. H., Kim, H., Moon, S., & Na, K. (2009). Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded nanoparticles mixed with human mesenchymal stem cell in fibrin hydrogel for bone tissue engineering. *J Biosci Bioeng*, 108(6), 530-537.

Pauwels A., S. K., Gracia G., . Guías para manejo de urgencias 4. Capítulo XIII. Trauma Maxilofacial. Fundación Santafé.

Perin, E. C., Geng, Y. J., & Willerson, J. T. (2003). Adult stem cell therapy in perspective. *Circulation*, 107(7), 935-938.

Peroni, D., Scambi, I., Pasini, A., Lisi, V., Bifari, F., Krampera, M., et al. (2008). Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Exp Cell Res*, 314(3), 603-615.

Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*, 25(11), 2896-2902.

Pieri, F., Lucarelli, E., Corinaldesi, G., Aldini, N. N., Fini, M., Parrilli, A., et al. (2010). Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. *Biomaterials*, 31(13), 3527-3535.

Pieri, F., Lucarelli, E., Corinaldesi, G., Fini, M., Aldini, N. N., Giardino, R., et al. (2009). Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. *J Oral Maxillofac Surg*, 67(2), 265-272.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.

Pittenger, M. F., Mosca, J. D., & McIntosh, K. R. (2000). Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol*, 251, 3-11.

- Prophet Edna B, M. B., Amington Yackely. (1992). *Methods in Histotechnology*.
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., et al. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*, 344(5), 385-386.
- Radosevich, M., Goubran, H. I., & Burnouf, T. (1997). Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang*, 72(3), 133-143.
- Rasmusson, I., Uhlin, M., Le Blanc, K., & Levitsky, V. (2007). Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 82(4), 887-893.
- Restrepo, S. (2009a). Secreción de factores angiogénicos en condiciones de normoxia e hipoxia en células stem mesenquimales humanas derivadas de médula ósea y tejido adiposo. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Restrepo, S. (2009b). *Secreción de factores angiogénicos en condiciones de normoxia e hipoxia en células stem mesenquimales humanas derivadas de médula ósea y tejido adiposo*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá
- Reynolds, M. A., Aichelmann-Reidy, M. E., Branch-Mays, G. L., & Gunsolley, J. C. (2003). The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol*, 8(1), 227-265.
- Ripamonti, U., & Petit, J. C. (2009). Bone morphogenetic proteins, cementogenesis, myoblastic stem cells and the induction of periodontal tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20(5-6), 489-499.
- Rodriguez, D. R. (2007). Movilización social para el control del cáncer en Colombia. *Instituto Nacional de Cancerología, documento tecnico 2*
- Roufosse, C. A., Direkze, N. C., Otto, W. R., & Wright, N. A. (2004). Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(4), 585-597.
- Ryu, J. H., Kim, I. K., Cho, S. W., Cho, M. C., Hwang, K. K., Piao, H., et al. (2005). Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium. *Biomaterials*, 26(3), 319-326.
- Salem, H. K., & Thiemermann, C. (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*, 28(3), 585-596.
- Salgado, A. J., Coutinho, O. P., & Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*, 4(8), 743-765.
- SALUD, M. D. (1993). RESOLUCION No 008430: Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Republica de Colombia.
- Salud, M. d. (2000). III ESTUDIO NACIONAL DE SALUD BUCAL – ENSAB III [Electronic Version]. *Salud Colombia*, 8,
- Sanchez Rafael , O. C. (2011). Comparación del efecto de medios condicionados de cultivos de 2 tipos de células madre mesenquimales sobre la cicatrización de heridas en ratones. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., & Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*, 19(5), 459-466.
- Schmidmaier, G., Schwabe, P., Strobel, C., & Wildemann, B. (2008). Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. *Injury*, 39 Suppl 2, S37-43.

Schmitz, J. P., & Hollinger, J. O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*(205), 299-308.

Schneider, R. K., Puellen, A., Kramann, R., Raupach, K., Bornemann, J., Knuechel, R., et al. (2010). The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials*, 31(3), 467-480.

Seiler, J. G., 3rd, & Johnson, J. (2000). Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc*, 9(2), 91-97.

Shanti, R. M., Li, W. J., Nesti, L. J., Wang, X., & Tuan, R. S. (2007). Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*, 65(8), 1640-1647.

Shih, D. T., Lee, D. C., Chen, S. C., Tsai, R. Y., Huang, C. T., Tsai, C. C., et al. (2005). Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells*, 23(7), 1012-1020.

Short, B., Brouard, N., Occhiodoro-Scott, T., Ramakrishnan, A., & Simmons, P. J. (2003). Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res*, 34(6), 565-571.

Sidelmann, J. J., Gram, J., Jespersen, J., & Kluft, C. (2000). Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms. *Semin Thromb Hemost*, 26(6), 605-618.

Slater, B. J., Kwan, M. D., Gupta, D. M., Panetta, N. J., & Longaker, M. T. (2008). Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*, 8(7), 885-893.

Sommerfeldt, D. W., & Rubin, C. T. (2001). Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*, 10 Suppl 2, S86-95.

Standeven, K. F., Ariens, R. A., & Grant, P. J. (2005). The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Rev*, 19(5), 275-288.

Stewart, M. C., & Stewart, A. A. (2011). Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 27(2), 243-261.

Tayapongsak, P., O'Brien, D. A., Monteiro, C. B., & Arceo-Diaz, L. Y. (1994). Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg*, 52(2), 161-165; discussion 166.

Thorn, J. J., Sorensen, H., Weis-Fogh, U., & Andersen, M. (2004). Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33(1), 95-100.

Timmers, L., Lim, S. K., Hoefer, I. E., Arslan, F., Lai, R. C., van Oorschot, A. A., et al. (2011). Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res*, 6(3), 206-214.

Tsiridis, E., Upadhyay, N., & Giannoudis, P. (2007). Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*, 38 Suppl 1, S11-25.

Valbonesi, M. (2006). Fibrin glues of human origin. *Best Pract Res Clin Haematol*, 19(1), 191-203.

van Poll, D., Parekkadan, B., Cho, C. H., Berthiaume, F., Nahmias, Y., Tilles, A. W., et al. (2008). Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology*, 47(5), 1634-1643.

Willerth, S. M., Arendas, K. J., Gottlieb, D. I., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2006). Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells. *Biomaterials*, 27(36), 5990-6003.

Wongchuensoontorn, C., Liebehenschel, N., Schwarz, U., Schmelzeisen, R., Gutwald, R., Ellis, E., 3rd, et al. (2009). Application of a new chair-side method for the harvest of mesenchymal stem cells in a patient with nonunion of a fracture of the atrophic mandible--a case report. *J Craniomaxillofac Surg*, 37(3), 155-161.

www.clinicaltrials.gov. (2012). clinicaltrials.gov.

Yamada, Y., Boo, J. S., Ozawa, R., Nagasaka, T., Okazaki, Y., Hata, K., et al. (2003). Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*, 31(1), 27-33.

Yamada, Y., Fujimoto, A., Ito, A., Yoshimi, R., & Ueda, M. (2006). Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. *Biomaterials*, 27(20), 3766-3781.

Yang, Y., Rossi, F. M., & Putnins, E. E. (2010). Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*, 31(33), 8574-8582.

Yoshikawa, T., a, b.,), , T. N., c, , H. M., d, et al. (2001). Bone and soft tissue regeneration by bone marrow mesenchymal cells. *Materials Science and Engineering C* 17(19-26).

Zelzer, E., & Olsen, B. R. (2003). The genetic basis for skeletal diseases. *Nature*, 423(6937), 343-348.

Zhang, Z. Y., Teoh, S. H., Chong, M. S., Lee, E. S., Tan, L. G., Mattar, C. N., et al. (2010). Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials*, 31(4), 608-620.

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., et al. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13(12), 4279-4295.