

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
POSTGRADO DE CIRUGÍA BUCAL

**CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES OBTENIDAS DE MÉDULA ÓSEA
HUMANA, COMO HERRAMIENTA PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO
ÓSEO**

Trabajo especial presentado ante
la Ilustre Universidad Central de
Venezuela por la Odontólogo
**María Fernanda del Castillo
García**, para optar al título de
Especialista en Cirugía Bucal.

Caracas, Mayo 2009

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
POSTGRADO DE CIRUGÍA BUCAL

**CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES OBTENIDAS DE MÉDULA ÓSEA
HUMANA, COMO HERRAMIENTA PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO
ÓSEO**

Autor: María Fernanda del Castillo García

Tutores: Dr. Raúl García-Arocha
Dr. Egidio Romano

Caracas, Mayo 2009

*El trabajo experimental de esta tesis fue realizado en el **Laboratorio de Patología Celular y Molecular** del Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) bajo la coordinación del **Dr. Egidio Romano***

DEDICATORIA

A mi madre, Yolanda García de del Castillo, que me dio la vida y me formó para ser la persona que soy hoy en día, por sus constantes consejos y su apoyo en todo momento. Por ser la persona más especial que he conocido y la mejor madre del mundo.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), centro fundamental de investigación científica y tecnológica del país, por su ilimitada colaboración para el desarrollo de este estudio.

Al laboratorio de Patología Celular y Molecular, perteneciente al Centro de Medicina Experimental del IVIC, por permitir desarrollar esta valiosa investigación.

A la Universidad Central de Venezuela, centro de referencia nacional e internacional, por la formación de profesionales altamente capacitados.

Al postgrado de Cirugía Bucal, coordinadores y demás docentes, por la formación que me brindó, tanto en lo clínico, como en lo humano.

A los tutores de este estudio, Dr. Egidio Romano y Dr. Raúl García-Arocha, por su inmensa colaboración y por su gran calidad humana y profesional.

A los demás investigadores del Laboratorio de Patología Celular y Molecular del IVIC, en especial a la MgSc. Olga Witting, al Dr. José Cardier, a la Dra. María Elena Márquez, al Lic. José Alonso y al Lic. Guillermo Suarez, por su constante ayuda y calidad profesional.

Al Centro de Cirugía experimental del IVIC, en especial al Dr. Cristian Sosa, por su colaboración en este estudio.

Al Servicio Odontológico del IVIC, en especial a la Dra. Edna Pereira, a la Dra. Carmen Strubinger y equipo de trabajo, por permitirnos el uso de sus equipos.

Al Servicio de Traumatología del Hospital Clínico Universitario, en especial al Dr. Cesar González y a su equipo de trabajo, por su amable colaboración para este estudio.

A la Unidad de Traumatología de miembros inferiores del Hospital Ortopédico Infantil, en especial al Dr. Ricardo Sulbarán, Dr. Omar Alvarado y su grupo de trabajo, por su cordial colaboración, así como también a la Dra. Mary Carmen González y al Dr. Esteban Papp, por su calidad humana y profesional.

Al Laboratorio de Histopatología bucal, “Dr. Pedro Tinoco”, Instituto de Investigaciones de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, en especial a la Dra. Helen Rivera y equipo de trabajo, por su gran colaboración en este estudio.

Al Dr. Jesús Rafael del Castillo, mi padre, por su incondicional colaboración y estímulo constante durante este estudio.

A mi familia, novio y amigos por el apoyo brindado.

INDICE DE CONTENIDOS	Página
I. Resumen	xiv
II. Introducción	1
III. Objetivos	33
IV. Materiales y Métodos	35
1. Obtención de Células Madre Mesenquimales	39
2. Aislamiento de Células Madre Mesenquimales	43
3. Selección del material de soporte y esquema de implantación	47
4. Estudio de expresión de marcadores de superficie en hMSCs mediante Citometría de Flujo	50
5. Análisis morfológico de hMSCs	51
6. Preparación de plasma rico en plaquetas	51
7. Protocolo quirúrgico y postquirúrgico	52
8. Preparación del espécimen para análisis radiográfico e histológico	56
V. Resultados	59
1. Aislamiento y cultivo de las hMSCs	59
2. Identificación de hMSCs mediante Citometría de flujo	59
3. Inducción in vitro de las hMSCs hacia células progenitoras osteogénicas	65
4. Inducción in vitro de las hMSCs hacia células progenitoras endoteliales	69

5.	Esquema de Implantación de las hMSCs	70
6.	Observación clínica	71
7.	Análisis macroscópico, radiográfico e histológico de los especímenes	71
VI.	Discusión	93
VII.	Conclusiones y proyecciones	103
VIII.	Referencias	106

INDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Anatomía de un hueso largo.	4
Figura 2. Proceso de remodelado óseo.	8
Figura 3. Colágeno como proteína estructural.	28
Figura 4. Proceso de formación de la molécula de colágeno.	29
Figura 5. Solubilización de la molécula de colágeno.	30
Figura 6. Presentaciones de atelocolágeno.	31
Figura 7. Esquema de obtención, aislamiento y cultivo de las células madre mesenquimales humanas.	42
Figura 8. Procedimiento quirúrgico para el desarrollo del defecto óseo y la implantación de células madre mesenquimales humanas.	55
Figura 9. Microfotografía de cultivo de células provenientes de médula ósea humana en medio de cultivo α MEM/Chang después de 15 días de cultivo.	62
Figura 10. Estudio de expresión de marcadores de superficie en células madre mesenquimales humanas.	63
Figura 11. Expresión de diferentes marcadores de superficie en las células mesenquimales aisladas, cultivadas y expandidas provenientes de médula ósea humana.	64

Figura 12. Células madre mesenquimales humanas en suspensión con las microesferas de colágeno a los 9 días de cultivo con medio osteogénico.	67
Figura 13. Células madre mesenquimales humanas en suspensión con las microesferas de colágeno a los 17 días de cultivo con medio osteogénico teñidas con rojo alizarina.	68
Figura 14. Evaluación macroscópica de los especímenes obtenidos a las 8 semanas post- implantación.	76
Figura 15. Evaluación macroscópica de los especímenes obtenidos a las 4 semanas post- implantación.	77
Figura 16. Observación radiográfica inicial de la porción anterior del ángulo mandibular.	82
Figura 17. Observación radiográfica de la porción anterior del ángulo mandibular a las 8 semanas post-implante.	83
Figura 18. Observación radiográfica de la porción anterior del ángulo mandibular a las 4 semanas post-implante.	84
Figura 19. Análisis histológico de los cortes obtenidos a partir de los especímenes mandibulares después de 8 semanas de la implantación, teñidos con Hematoxilina-Eosina	90
Figura 20. Análisis histológico de los cortes obtenidos a partir de los especímenes mandibulares después de 4 semanas de la implantación, teñidos con Hematoxilina-Eosina	91

Figura 21. Análisis histológico de los cortes obtenidos a partir de los especímenes mandibulares después de 4 semanas de la implantación, teñidos con azul de Toluidina.

92

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla I. Análisis histológico de las muestras tomadas a partir de las zonas implantadas en los especímenes mandibulares de los seis conejos.	89
--	----

RESUMEN

Las deficiencias de tejido óseo en la región buco-maxilofacial, sigue siendo un gran problema clínico. El objetivo de este estudio fue evaluar, en un modelo animal, la capacidad de células madre mesenquimales (MSCs), provenientes de médula ósea humana, de regenerar tejido óseo, en conjunto con microesferas de atelocolágeno (como soporte osteoconductor) y plasma rico en plaquetas (como fuente de factores osteoinductores). Para ello se aisló, cultivó, expandió y diferenciaron células madre mesenquimales humanas (hMSCs), que fueron implantadas en defectos óseos de tamaño crítico en la región mandibular de seis conejos, bajo diferentes condiciones de implantación y evaluadas radiográfica e histológicamente. Así, a las 8 semanas de haber implantado las hMSCs, cultivadas en medio de diferenciación para precursores osteogénicos, incluidas en plasma rico en plaquetas de conejo, hubo cierto grado de regeneración ósea, pero no se observaron diferencias importantes al compararlas con su control, en donde solo se implantó microesferas de atelocolágeno incluidas en plasma rico en plaquetas. Sin embargo, el implante de hMSCs expandidas y recultivadas en medios de diferenciación osteogénica y endotelial, durante 18 días, junto con microesferas de atelocolágeno, incluidas en plasma rico en plaquetas humano, fue más efectivo para promover la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico.

INTRODUCCIÓN

Las deficiencias de tejidos en la región buco-maxilofacial, son frecuentemente producto de cirugías agresivas por cáncer, trauma, pérdida de dientes, proceso de reabsorción, lesiones quísticas, enfermedades esqueléticas deformantes o malformaciones congénitas. Dichas circunstancias dejan al cirujano con el gran reto de reparar estas deficiencias, utilizando materiales aloplásticos o tejidos autólogos, generalmente insuficientes. Estos procedimientos presentan limitaciones inherentes a cada uno de ellos, como son: hemorragias, lesión a nervios, alteraciones estéticas, dolor, infecciones, pérdida de la función y alta morbilidad del área donante ⁽¹⁾. Además, por lo general, los tejidos del área donante son limitados para satisfacer la reconstrucción propuesta, ya que estos tejidos suelen ser escasos o difícil de adaptar en el sitio a injertar ⁽²⁾. Sin embargo, y a pesar de los altos costos quirúrgicos, el uso de tejidos autólogos para reparar defectos óseos, continua siendo el método más utilizado ⁽³⁾.

Estructura ósea

Uno de los tejidos más afectados por lesiones, en la región buco-maxilofacial, es el tejido óseo. El hueso o tejido óseo es un tejido conectivo especializado y constituye la mayor parte del esqueleto de los vertebrados

superiores. Incluye células y una matriz intercelular o sustancia fundamental. La matriz incluye un componente orgánico, principalmente fibras colágenas, y un componente inorgánico, sales inorgánicas (85% fosfato de calcio, 10% carbonato de calcio, cloruro de calcio y cloruro de magnesio) ⁽⁴⁾.

La matriz orgánica del hueso está compuesta en un 50 a 95% por colágeno, el resto es un medio gelatinoso homogéneo denominado sustancia fundamental. Las fibras de colágeno se disponen primariamente siguiendo las líneas de fuerza tensional. La sustancia fundamental está compuesta de líquido extracelular más proteoglicanos, especialmente, condroitín-sulfato y ácido hialurónico, que ayudan a controlar el depósito de sales de calcio ⁽⁵⁾.

Macroscópicamente pueden distinguirse dos tipos de hueso: el hueso esponjoso (trabecular) y el hueso compacto (denso). El hueso esponjoso es ricamente vascularizado, incluye trabéculas irregulares delgadas o tabiques que se ramifican y unen entre sí para formar una trama reticular, cuyos espacios de intercomunicación están llenos de médula ósea. El hueso compacto tiene aspecto sólido, salvo en lo que respecta a los espacios microscópico. Está compuesto por Osteones y los sistemas de Havers, por sustancia intersticial y por sustancia circunferencial, que esta ubicada entre los osteones y los sistemas de Havers. Esta sustancia circunferencial tiene una cubierta externa, que es el periosteo y otra interna, que es el endosteo. No puede hacerse un límite entre los dos tipos de tejido óseo, las diferencias

entre ellos depende solo de la cantidad relativa de sustancia sólida, tamaño y número de los espacios entre ellos ⁽⁶⁾.

En los huesos largos, la diáfisis es principalmente hueso compacto que contiene en su interior una cavidad medular (médula ósea). Cada extremo (epífisis) contiene hueso esponjoso cubierto por una capa delgada de hueso compacto. En los huesos planos, dos láminas de hueso compacto incluyen una capa media de hueso esponjoso ⁽⁷⁾.

Cada hueso, excepto en sus caras articulares, está cubierto por un revestimiento de tejido conectivo especializado, el periostio. Una capa de tejido conectivo semejante, pero menos desarrollada, el endostio, recubre la cavidad medular y los espacios medulares (Figura 1) ⁽⁷⁾.

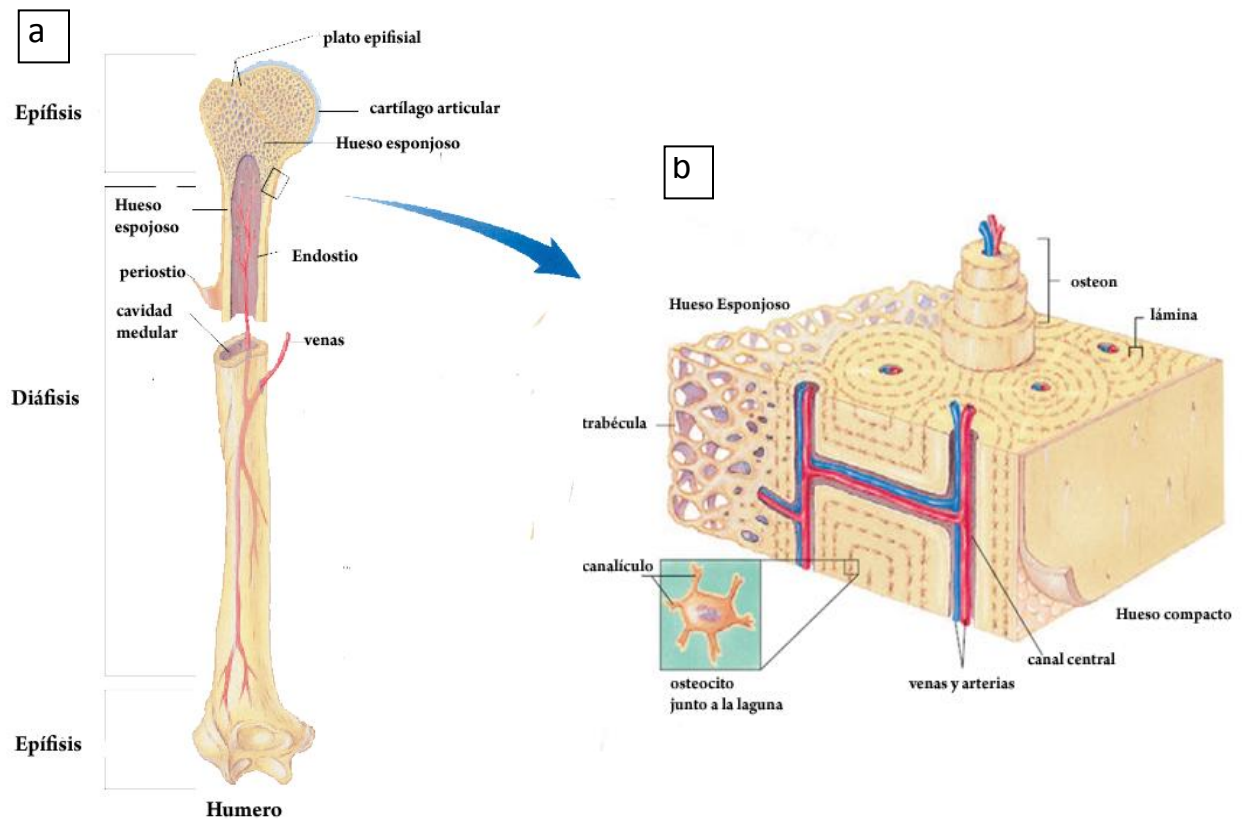


Figura 1. Anatomía de un hueso largo. a. un hueso largo recubierto por periostio a excepción de la epífisis, la cual está cubierta por cartílago articular. El hueso esponjoso de la epífisis contiene médula ósea roja. La diáfisis contiene médula ósea amarilla y está rodeada de hueso compacto. b. Detalles de la anatomía del hueso esponjoso y hueso compacto con vista en macro de un osteocito en una laguna. Tomada de Mader, 2004 ⁽⁷⁾.

Histológicamente el tejido óseo esta compuesto por:

- Osteoblastos: se asocian con la osteogénesis y se encuentran en relación con la superficie del hueso en donde se deposita la matriz ósea
- Osteocitos: son osteoblastos que han permanecido incluidos en la matriz ósea, para repararla.
- Osteoclastos: se encuentran en asociación íntima con la superficie del hueso, con frecuencia en excavaciones poco profundas conocidas como lagunas de Howship. Los osteoclastos reabsorben la matriz ósea y solubilizan las sales minerales después de los procesos reparativos ⁽⁴⁾.

Desarrollo óseo, según su origen

Según el origen embriológico, hay dos tipos de desarrollo óseo, el intramembranoso y el endocondral o intracartilaginoso. La osificación intramembranosa se presenta en los huesos planos. Durante este proceso, las **células madre mesenquimales (MSCs, del inglés Mesenchymal Stem Cells)** que se encuentran en el tejido conectivo embrionario, altamente vascularizado, se diferencian en preosteoblastos y luego en osteoblastos, para sintetizar matriz ósea que contenga fibras colágenas. Los vasos sanguíneos se incorporan dentro de las trabéculas para formar la médula ósea hematopoyética. En la periferia, las MSCs continúan proliferando y diferenciándose, lo que se conoce como

crecimiento aposicional. Posteriormente, este hueso inmaduro es remodelado, hasta ser remplazado de manera progresiva por el hueso laminar maduro ⁽⁶⁾.

La osificación endocondral, ocurre en los huesos largos y consiste en que las MSC se diferencian en precondroblastos y luego en condroblastos, productores de matriz cartilaginosa. Progresivamente la matriz cartilaginosa envuelve a las células productoras, llamadas para este momento condrocitos, y permanecen en una laguna (ver Figura 1). A diferencia de los osteocitos, pueden continuar proliferando por algún tiempo, gracias a la consistencia de gel que posee el cartílago. Este tipo de crecimiento por síntesis de una matriz entre los condrocitos, se conoce como crecimiento intersticial, además se presenta el crecimiento aposicional a nivel del pericondrio. Posteriormente los condrocitos crecen, se hipertrofian y son calcificados, el cartílago calcificado es remplazado por hueso ⁽⁶⁾.

Remodelado óseo

El hueso está siendo continuamente depositado por los osteoblastos en las superficies externas de los huesos y continuamente absorbido donde se encuentran activos los osteoclastos, que son células fagocitarias grandes multinucleadas, derivadas de monocitos o células

análogas formadas en la médula ósea. Los osteoclastos emiten proyecciones, análogas a vellosidades, hacia el hueso, formando un borde fruncido contiguo al hueso. Las vellosidades secretan enzimas proteolíticas y ácidos (ácido cítrico y láctico). Estas enzimas digieren y disuelven la matriz orgánica del hueso y los ácidos disuelven las sales óseas ⁽⁵⁾.

Los procesos de formación y reabsorción ósea se encuentran íntimamente coordinados en cada unidad de hueso remodelado. El proceso de remodelación ósea comienza a través de señales químicas provenientes de los osteoblastos inactivos. Estas señales paracrinas estimulan la diferenciación de los precursores osteoclásticos y activan a los osteoclastos maduros. Estos osteoclastos reabsorben un segmento óseo, y luego los macrófagos locales terminan de degradar los residuos del proceso de reabsorción. Luego los osteoblastos son recluidos para formar nueva matriz ósea mineralizada, en la cavidad generada durante el proceso de reabsorción ⁽⁸⁾.

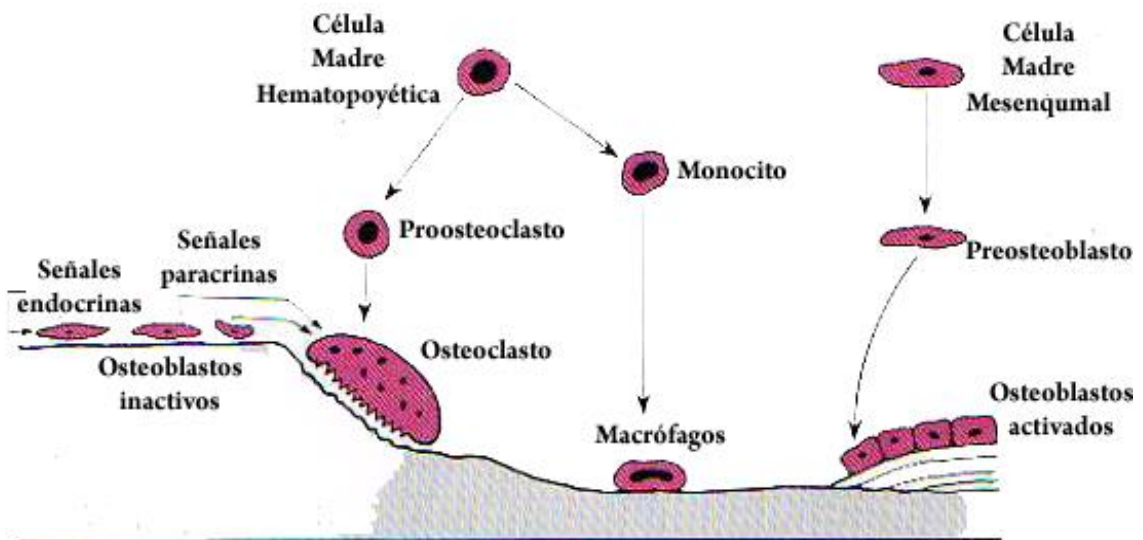


Figura 2. Proceso de remodelado óseo. Las señales endocrinas dirigidas a los osteoblastos inactivos generan señales paracrinas locales hacia los osteoclastos cercanos y sus precursores. Los osteoclastos reabsorben un área de hueso mineralizado, y los macrófagos locales completan el proceso de disolución de elementos fagocitados. Luego el proceso es revertido a formación ósea a través del reclutamiento de precursores osteoblásticos hacia el sitio a remodelar, y su diferenciación a osteoblastos activados. Ello permite la mineralización ósea y formación de matriz orgánica extracelular. De este modo, el hueso neoformado reemplaza el hueso maduro reabsorbido previamente. Tomada de Berne, 1998

(8)

Normalmente, las tasas de depósito y de reabsorción de hueso son iguales, de forma que la masa ósea permanece constante. Los osteoclastos habitualmente se encuentran en forma de masas pequeñas concentradas, y una vez que comienzan a desarrollarse una masa de osteoclastos, suelen fagocitar hueso durante unas tres semanas, excavando un túnel de entre 0,2 y 1 mm de diámetro y varios mm de longitud. Al cabo de ese tiempo los osteoclastos desaparecen y en su lugar el túnel es invadido por osteoblastos. Empieza a desarrollarse hueso nuevo durante varios meses, el hueso nuevo va depositándose en sucesivas capas concéntricas en la superficie interna de la cavidad, hasta que es cubierto el túnel. Este depósito de hueso nuevo cesa cuando es invadido por vasos sanguíneos (a través del canal o conducto de Havers). Cada nueva área de hueso depositado de esta manera se denomina osteona ⁽⁵⁾.

Esta capacidad autorrenovadora del hueso se conoce desde hace algún tiempo y ha sido utilizada con éxito por los cirujanos en la reparación de las lesiones óseas. No obstante, dicha capacidad está limitada por encima de cierto tamaño del defecto (tamaño que depende a su vez de su localización anatómica y naturaleza del hueso), quedando por lo tanto sin repararse el defecto óseo y formándose en su lugar un tejido fibroso ⁽⁹⁾.

Reparación y regeneración ósea

Tras una lesión ósea se suelen distinguir tres etapas en su reparación:

1. Formación del coagulo, ocurre inmediatamente tras la lesión y suele venir acompañada de un proceso de inflamación. Es una etapa crítica, pues desencadena el conjunto de sucesos celulares y moleculares que conducen a la regeneración ósea final. El tejido lesionado es en estos momentos hipóxico y acidótico, contiene una mezcla de plaquetas, leucocitos, hematíes y fibrina, formando un coagulo, una malla tridimensional biodegradable capaz, por una parte de controlar la hemostasia de la herida, pero, al mismo tiempo, de permitir el paso al exterior de señales y factores liberados por la plaquetas presentes en el coagulo (PDGF, del ingles Platelet Derived Grow Factor; TGF- β , del ingles Transforming Grow Factor β y IGF-I, del ingles Insulin like Grow Factor) ⁽⁹⁾. Estos factores realizan dos funciones importantes, por una parte (TGF- β y IGF-I) activan y favorecen la proliferación de células madre presentes; y por otra parte el PDGF junto con el gradiente de O₂ que existe entre el coagulo y el tejido circundante, realizan una acción quimiotáctica y de activación de macrófagos, que a su vez, son fuente de factores de crecimiento para la segunda etapa de la regeneración ósea (10, 11).

2. Proliferación y diferenciación celular, hacia los días 3 -5 se comienza a formar un tejido de granulación, formado por células, colágeno y nuevos vasos. Ellos comienzan a penetrar el tejido y aportan nutrientes así como células indiferenciadas capaces de evolucionar hacia fenotipos osteoblásticos mediante la acción de diferentes factores morfodiferenciadores (proteínas morfogenéticas óseas, BMP del inglés Bone Morphogenetic Proteins). De esta manera, se acumulan los productos de secreción de las células y comienza a formarse el callo óseo. El hueso inicial es desorganizado, sin sistemas haversianos, desarrollándose las 4 primeras semanas. En este período es fundamental la presencia de factores de diferenciación, como las proteínas morfogenéticas (BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 y BMP-7, relacionados con angiogénesis y diferenciación celular), junto con los diferentes factores de crecimiento, para permitir la reparación ósea entre las 6 a 8 semanas de haberse generado una lesión ⁽⁹⁾.

3. Remodelación ósea: última etapa, en la que la acción conjunta de factores de crecimiento, las BMP y de los osteoblastos y osteoclastos, transforman el hueso desorganizado en una estructura laminar madura y organizada ⁽⁹⁾.

Existen sucesos que se superponen a lo largo del proceso de regeneración ósea: La Osteogénesis, que es la formación de hueso nuevo a partir de células osteogénicas; la Osteoinducción, que se refiere

a la estimulación de osteogénesis mediante diferentes factores, capaces de reclutar células osteogénicas y de diferenciar células hacia fenotipos osteogénicos y la Osteoconducción, que es el desarrollo de una matriz o malla tridimensional que sirve de soporte para la formación de este nuevo hueso ⁽⁹⁾.

Biomateriales utilizados para regeneración ósea

Desde hace algún tiempo, materiales osteoconductores, han sido utilizados para preservar, por un período limitado de tiempo, dimensiones óseas y así evitar la necesidad de crear un segundo sitio quirúrgico ⁽³⁾. Estos materiales pueden ser de origen natural o sintético. Los materiales de origen natural corresponden al hueso, tanto homólogo como heterólogo, otros derivados óseos y polímeros naturales, como el colágeno. Los materiales sintéticos consisten en ciertos metales, polímeros biodegradables y fosfatos cálcicos, que pretenden imitar la estructura física de los materiales de origen natural ⁽¹²⁾. La búsqueda de un «biomaterial ideal» para la reparación de las lesiones descritas, intenta reproducir los beneficios de los injertos autólogos. Un «biomaterial ideal» debe describirse para cada tipo de lesión, localización y paciente, pero de modo general se puede definir como un material que sea biocompatible, no tóxico y en el mejor de los casos ser biodegradable ⁽¹³⁾.

A pesar de los beneficios mencionados, la utilización y manipulación de los materiales biocompatibles sigue siendo un problema clínico. La reconstrucción, tanto del tejido duro como del blando utilizando estos materiales, no restablece totalmente el estado de normalidad y salud a las estructuras afectadas de la región Buco-Maxilofacial ⁽¹⁴⁾. Además, por sus características químicas, poseen una limitada incorporación al tejido circundante y una lenta reabsorción ⁽³⁾. Estos materiales artificiales presentan mayor susceptibilidad a generar infecciones y períodos prolongados e indeterminados de reacciones adversas al hospedero ⁽²⁾.

Nuevos enfoques para la regeneración ósea

Una alternativa viable a estos procedimientos, para crear sistemas más efectivos y seguros que regeneren el tejido óseo perdido, podría ser una nueva disciplina que combine la “Terapia Celular” con la “Ingeniería de Tejidos”. Esta nueva tecnología terapéutica induciría a la regeneración ósea a través del uso de una combinación de células osteogénicas, factores de crecimiento osteoinductores y soportes biocompatibles ⁽³⁾.

La “Ingeniería de Tejidos” constituye un nuevo campo interdisciplinario, que aplica principalmente la Biología Celular y la Ingeniería, para descubrir sustitutos biológicos que restauren, mantengan y devuelvan la función a los tejidos dañados o perdidos; por lo que se perfila como una buena alternativa

para la regeneración y reconstrucción de tejidos ⁽¹⁾. El desarrollo básico de la Ingeniería de Tejidos esta basado principalmente en el uso de Células Madre (CM; del ingles stem cells, SC), aisladas y expandidas en cultivos en el laboratorio, diferenciadas convenientemente de acuerdo al tejido a regenerar, seguido de su reimplantación en las regiones afectadas, adheridas o incluidas en un material de soporte específico ⁽¹⁾.

El término “Ingeniería de Tejidos” fue oficialmente presentado en el Consejo de la National Science Foundation en 1998, para definir la aplicación de los principios y métodos de la Ingeniería y la Biología Celular, con el fin de entender la relación entre estructura y función de los tejidos animales, en situación de normalidad y en situaciones patológicas; de esta manera descubrir sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de los tejidos ⁽¹⁵⁾.

Células Madre

Las células madre se encuentran en todos los organismos multicelulares. Se caracterizan por su habilidad de autorenovación y capacidad de división y diferenciación hacia los diferentes tipos de células especializadas provenientes de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). Las investigaciones acerca de las células madre,

se iniciaron a partir de los estudios y descubrimientos del científico canadiense Ernest A. McCulloch y James E. Till en 1960 ^(16, 17).

Los dos tipos principales de células madre son: células madre embrionarias, aisladas a partir de embriones en etapa de blastocito, y aun en etapas previas; células madre fetales, aisladas de tejidos fetales y células Madre Adultas, encontradas en los diferentes tejidos adultos. En embriones las células Madre pueden diferenciarse hacia todos los tejidos embrionarios especializados. En organismos adultos, las células madre y células progenitoras, actúan como sistemas reparativos, reemplazando células especializadas. Entre ellas se encuentran las células especializadas de médula ósea, sistema nervioso, sistema gastrointestinal, músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, piel, córnea, páncreas, pulmón y tejido dentario ⁽¹⁸⁾.

Las células madre adultas son capaces de diferenciarse funcionalmente a células especializadas procedentes de otra capa embrionaria distinta a la originaria ^(19, 20). Se cree que dicha capacidad de diferenciación se presenta como respuesta a cambios del microambiente en el que se desarrollan ^(18, 19).

Células Madre Mesenquimales

Se han identificado dos grupos principales de células madre (CM, del inglés SC) adultas en la médula ósea: CM hematopoyéticas y CM mesenquimales. Las células madre hematopoyéticas dan origen a las células del tejido sanguíneo ⁽¹⁸⁾, mientras que las Células Madre Mesenquimales (MSCs) son células estromales no hematopoyéticas ⁽¹⁾.

Las MSCs poseen capacidad de diferenciación y contribuyen a la regeneración de tejidos Mesenquimales como hueso, cartílago, músculo, tendones, ligamentos y tejido adiposo. Ellas presentan la habilidad de expandirse al ser cultivadas, manteniendo su potencial de crecimiento multilíneaje. Dicho potencial de diferenciación multilíneaje, permite que las MSCs se diferencien hacia células con un fenotipo osteogénico. Según lo que demuestran importantes estudios, ellas son capaces de promover efectivamente osteogénesis in vitro ⁽³⁾.

Fenotípicamente, las MSCs humanas adultas se identifican por la expresión de varios marcadores de superficie, incluyendo CD105 (SH2), CD73 ((SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71, así como también moléculas de adhesión como, CD106 (molécula de adhesión de células vasculares 1, VCAM-1, por su significado en inglés vascular cell adhesion molecule), CD166 (molécula de adhesión de células leucocitarias activadas 1, ALCAM1,

por su significado en inglés activated leukocyte cell adhesion molecule), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y CD29. No expresan los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34 CD14 y CD11. Tampoco expresan moléculas coestimuladoras como, CD80, CD86 o CD40; ni moléculas de adhesión como, CD31 (molécula de adhesión plaquetaria/células endoteliales 1, PECAM-1, por su significado en inglés platelet/endotelial cell adhesion molecule) y CD18 (antígeno asociado a función leucocitaria 1, LFA-1, por su significado en inglés leukocyte function-associated antigen-1) ⁽²¹⁻²⁶⁾.

Todas estas propiedades hacen a las Células Madre Mesenquimales (MSCs) candidatas ideales para la Ingeniería de Tejidos. Se ha demostrado en modelos animales que al ser trasplantadas sistémicamente, son capaces de migrar a los sitios de daño tisular, lo que indica que también poseen capacidad migratoria a sitios específicos, o de “Homing” (anidar). Sin embargo, el mecanismo de “Homing” no está bien definido. Receptores para quimiocinas y moléculas de adhesión, juegan un papel importante en el tráfico de precursores dentro del tejido en cuestión y en su capacidad de habitar el tejido a reparar ⁽²⁷⁾.

Las MSCs pueden ser aisladas a partir de médula ósea, que constituye un complejo celular heterogéneo compuesto por células sanguíneas de todas las series eritroide, mieloide, linfoide, plaquetaria,

monocítica, NK, en todas las fases de maduración y además de Células Madre Hematopoyéticas, adipocitos, osteoblastos/osteoclastos, fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso y células madre mesenquimales. La médula ósea fue tradicionalmente reconocida por su importante rol en la hematopoyesis ⁽²⁸⁾. En un estudio pionero realizado por Friedenstein y col. ⁽²⁹⁾, hace más de 30 años, propuso que la médula ósea de organismos posnatales contenía células fibroblastoides adherentes, capaces de generar colonias parecidas a hueso y a cartílago ⁽²⁹⁾. Originalmente llamadas “colony forming unit-fibroblast (CFU-F),” a estas células se les ha denominado “Células Estromales de Médula ósea” ⁽³⁰⁾, “Células Mesenquimales progenitoras” ⁽²⁴⁾ y “Células Madre Mesenquimales” ⁽³¹⁾. Diferentes estudios posteriores, confirmaron la presencia de células progenitoras no hematopoyética en médula ósea, que podían ser aisladas, como lo había reportado previamente Friedenstein y col. ⁽³²⁻³⁴⁾. Aunque originalmente fueron identificadas en roedores, las MSCs se han aislado a partir de médula ósea humana ⁽²³⁾, de médula ósea de gatos, de perros, de ovejas, de ratas, de ratones y de conejos ^(1, 35, 36).

Actualmente, la Médula ósea constituye la fuente más utilizada para obtener MSCs y el entendimiento de sus características y propiedades biológicas se ha dado a partir de las células derivadas de médula ósea. Además, la médula ósea es considerada la fuente de MSC más accesible y rica. Las técnicas para aislar las MSCs a partir de médula ósea, van desde

la aspiración y separación por centrifugación en gradiente de densidad, hasta un simple método directo de cultivo en placas ^(37, 38). Estudios preliminares han demostrado que las MSCs, obtenidas por diferentes metodologías para su aislamiento, son muy similares y poseen el mismo potencial de diferenciación ⁽³⁹⁾.

Hasta la presente fecha, no está totalmente claro un fenotipo característico de las MSCs, sin embargo, estas células son generalmente definidas basándose en su habilidad de diferenciarse hacia linajes mesenquimales determinado, cuando son inducidas para ello. Por ahora, no hay un único marcador en específico que identifiquen definitivamente las MSCs in vivo ⁽¹⁾.

Otras fuentes adicionales de Células Madre Mesenquimales (MSCs), incluyen, el periostio, la membrana sinovial, el músculo, el tejido adiposo, el ligamento periodontal, la pulpa dental de dientes deciduos, la dermis, el líquido amniótico y el tejido fetal ⁽⁴⁰⁾. Recientemente, se ha demostrado que las MSCs también pueden ser aisladas a partir de explantes de fragmentos de hueso trabecular tratado con colagenasa ⁽¹⁾. Aunque existen diferentes fuentes de MSCs, el *estroma* de la médula ósea constituye el mayor depósito de ellas, las cuales son llevadas a los diferentes tejidos a través de la circulación, migrando y adoptando, subsecuentemente, las características

requeridas para el mantenimiento y reparación de un tipo de tejido en específico ⁽³⁹⁾.

Las MSCs forman solo un 0,001% a un 0,01% del total de la población de las *células nucleadas* de la médula ósea, las cuales juegan importantes funciones ⁽²³⁾. Debido a su ubicación en la Médula ósea, las MSCs están vinculadas con la reparación de las microfracturas ósea que ocurren a diario. También las MSCs pueden viajar hacia otros sitios a distancia para servir de fuente de *células progenitoras* durante el crecimiento y la reparación de los tejidos. Esto se demostró durante la reparación muscular, donde las MSCs, derivadas de médula ósea, migraron hacia las áreas donde se indujo una degeneración muscular y ocurrió la diferenciación miogénica, y su participación en la regeneración de las fibras musculares dañadas. ⁽¹⁾

La potencial utilidad clínica de las MSCs es aún mayor por sus propiedades inmunológicas. Las MSCs son generalmente descritas como no inmunogénicas, en el sentido de no inducir rechazo heterólogo mediado por células, basado en su fenotipo MHC clase I -, MHC clase II -, CD40 -, CD80 -, y CD86 - ⁽⁴¹⁾. Diferentes investigadores han realizados cultivos de MSCs con linfocitos T in vitro y han reportado inducción de inmunotolerancia, gracias a este fenotipaje ⁽⁴²⁾. Según Di Nicola y col., las Células Estromales de Medula ósea (BMSCs, del inglés Bone Marrow Stromal Cells), autólogas o alogénicas, suprimen fuertemente la proliferación de linfocitos T. Esta

inhibición de células T no se debe a la inducción de apoptosis, sino por la producción de factores solubles ⁽⁴²⁾. Sin embargo, el mecanismo de esta inmunosupresión no se conoce en su totalidad, algunos investigadores sugieren una supresión mediada por contacto célula con célula, mientras otros han reportado un mecanismo mediado por factores solubles ^(41, 42)

Las células madre mesenquimales humanas (hMSCs) son aisladas de la capa mononuclear de la médula ósea, después de su separación por centrifugación en un gradiente de densidad (también pueden ser aisladas directamente por adhesión al plástico de frascos o placas de cultivo). Luego estas células mononucleares son cultivadas en un medio con suero fetal y las Células Madre Mesenquimales se adhieren al plástico de la placa utilizada para el cultivo. Algunas células hematopoyéticas también se adhieren, pero a medida que se realizan los lavados solo quedan adheridas las MSCs. ⁽²⁷⁾

Las MSCs proveen una herramienta importante para la Ingeniería de Tejidos Maxilofaciales, ya que: 1. Su uso no genera controversias éticas ni legales. 2. Son generalmente consideradas como accesibles y disponibles. 3. Poseen la capacidad de autorenovación y de expansión. 4. Tienen la capacidad de diferenciación hacia los tipos celulares de los tejidos de la región Maxilofacial. 5. Poseen la habilidad de no ser inmunogénicas y de no inducir tumores ⁽¹⁾.

Plasma rico en plaquetas

Durante etapas tempranas de la cicatrización, las plaquetas liberan gran cantidad de factores de crecimiento autólogos, que incluyen, Factor de crecimiento plaquetario (PDGF), Factor de crecimiento de Transformación beta1 y beta2 (TGF- β 1 y TGF- β 2), Factor de crecimiento similar a la insulina “insulin-like” (IGF), Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor de crecimiento vascular, fibrina, fibronectina y vitronectina, así como también Factor de crecimiento para hepatocitos ⁽⁴³⁾. Ellos inician una cascada de eventos celulares y moleculares, que resultan en una cicatrización altamente regulada y coordinada ⁽⁴⁴⁾. Desde hace algún tiempo, se han desarrollado ciertas estrategias para acelerar la cicatrización ósea, entre las que se encuentra el uso del plasma rico en plaquetas ⁽⁴⁵⁾. El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es un concentrado de plasma autólogo, que posee una concentración de plaquetas de aproximadamente tres a cuatro veces mayor a los niveles del plasma y constituye una fuente rica en diversos factores de crecimiento osteogénico ⁽⁴⁴⁾.

Whitman y col. fueron los primeros en describir el uso del plasma rico en plaquetas en el campo odontológico, mostrando que la aplicación de las plaquetas al tejido subyacente permitió una mejor adaptación del colgajo, una mejor hemostasia y aseguró un cierre más definitivo, en comparación con el cierre primario por sí solo ⁽⁴⁶⁾. Estudios posteriores realizados por Marx

y col. ⁽⁴⁷⁾, demostraron un incremento radiográfico significativo sobre la maduración ósea en injertos colocados en humanos. Subsecuentemente, ha habido un interés considerable en evaluar este método de promoción de la cicatrización y regeneración. En particular, se ha dado el debate, acerca de que si, el PRP debe ser utilizado solo o en conjunto con materiales de injerto; para así llevar los factores de crecimiento al sitio de la herida, especialmente con el fin de mejorar la regeneración ósea y/o periodontal ⁽⁴⁸⁾. Ha sido reportado que el Plasma rico en plaquetas (PRP) puede acelerar la formación ósea y que el gran número de plaquetas que este contiene, liberan una cantidad significativa de factores de crecimiento los cuales promueven la regeneración ósea. ⁽⁴⁹⁾.

También se ha reportado, que el uso de PRP de manera local, mejora la maduración de injertos óseos ⁽⁵⁰⁾. Según Goto y col., la aplicación del complejo PRP/osteoblastos, posee un efecto beneficioso, promocionando la diferenciación osteoblásticas, para el trasplante de dichas células, tratadas a través de la Ingeniería de Tejidos, en defectos óseos ⁽⁵¹⁾.

Según Camargo y col., la combinación de PRP con sustitutos de hueso (hueso bovino granulado) o con guías para regeneración tisular, fueron efectivas como tratamiento regenerativo para defectos intraóseos, en pacientes con enfermedad periodontal avanzada ⁽⁵²⁾. El PRP posee efecto mitogénico e inductor para la diferenciación de osteoblastos, in vitro. Posee

un efecto favorable sobre las células osteoblásticas humanas, de manera de que mejora la cicatrización y la regeneración ósea ⁽⁵³⁾.

Sin embargo, Aghaloo y col. no observaron una mejoría radiográfica e histomorfométrica significativa, durante la formación ósea, con la aplicación de PRP solo, en defectos con tamaños no críticos en un modelo animal desarrollado en cráneo de conejo. A pesar de lo anterior, la combinación de hueso mineralizado con PRP, demostró tendencias histomorfométricas hacia un incremento en la formación ósea en los meses 1, 2 y 4 posterior a su aplicación ⁽⁴⁹⁾

Los factores liberados por las plaquetas son fuertes Inductores angiogénicos y se sabe que son mitogénicos para las MSCs in vitro ^(54, 55). Según Kandler y col., las Células Estromales de Medula ósea, mostraron un incremento en la actividad mitogénica y en la motilidad quimiotáctica, cuando se exponían a PRP ⁽⁵⁴⁾. Sin embargo, la capacidad para mejorar las propiedades osteogénicas de las MSCs in vivo, no ha sido bien caracterizada ⁽⁵⁴⁾. Recientes estudios han sugerido un efecto sinérgico positivo de la combinación de las MCSs con coágulos autólogos formados a partir de plasma rico en plaquetas (PRP) para aumentar la formación ósea en la región buco-maxilofacial ⁽⁵⁶⁾.

El uso de fibrina (contenida en el PRP) como un material osteoconductor y como un medio para combinar con los diferentes injertos, ha sido reportado. También se ha reportado la importancia de los factores de crecimiento hallados en la fibrina adhesiva autóloga. Por lo tanto, se ha propuesto el uso del gel de PRP, conformado por una mezcla de plasma rico en plaquetas, derivado de varias centrifugaciones de sangre completa autóloga, con trombina y cloruro de calcio en regeneración ósea ⁽¹⁴⁾. Una vez que las plaquetas son activadas en presencia de trombina, liberan sus factores y empieza a formarse el soporte para el nuevo coagulo de fibrina. De esta manera, el PRP pudiera acelerar y mejorar la regeneración ósea, así como también una cicatrización del tejido blando más rápido y predecible ⁽⁵⁶⁾.

Varios investigadores han evaluado el efecto clínico del PRP sobre la regeneración ósea y periodontal ^(48, 57). Según Lekovic, la técnica de combinar PRP/partículas de hueso bovino/guía de regeneración tisular, constituye una modalidad efectiva para tratar defectos de furca grado II mandibulares ⁽⁴⁸⁾. Sin embargo, no existe un consenso generalizado en lo que se refiere a la efectividad del PRP. A pesar de estudios tempranos prometedores, estos han sido objetados por hallazgos negativos más recientes ^(58, 59). Según Hatakeyama y col., la asociación de PRP con hueso autólogo no mejoró el proceso de cicatrización ⁽⁵⁸⁾; y según el trabajo realizado por Dori y col., el PRP falló en mejorar los resultados obtenidos con el hueso mineralizado natural más las guías de regeneración tisular ⁽⁵⁹⁾.

Materiales de soporte para regeneración ósea

La regeneración ósea con el uso de las MSCs, se ve influenciada por el hecho de que durante su implantación, deben ser colocadas sobre un soporte apropiado, el cual es necesario para llevar las células y factores de crecimiento, manteniendo funciones mecánicas temporales ⁽³⁾.

El éxito de la regeneración o reemplazo de los tejidos en la región maxilofacial, va a depender no solo de la selección de la células apropiadas, sino también del material de soporte o andamio utilizado, que debe poseer propiedades biológicas y fisiológicas que resulten en opciones clínicas favorables. El uso de biomateriales sintéticos o naturales como soporte para llevar las MSCs, han mostrado gran aplicabilidad para las terapéuticas craneofaciales, especialmente para la formación de hueso. Los parámetros que deben ser considerados para la selección de un material de soporte ideal incluyen, por lo menos, las siguientes propiedades fisicoquímicas y biológicas: área de superficie, porosidad, arquitectura tridimensional, características de degradación, integridad mecánica, biocompatibilidad y habilidad para soportar la proliferación celular, diferenciación, angiogénesis y depósito de matriz producidas por las MSCs ⁽¹⁾.

Existen varios candidatos de materiales de soporte aplicables para la ingeniería de las estructuras maxilofaciales, como los biopolímeros naturales

(alginato y colágeno) o los polímeros sintéticos (policaprolactona y poli DL-lactic-co-glycolide (PLGA). La importancia biológica de estos materiales de soporte radica en que logran imitar la arquitectura de la matriz extracelular del tejido natural ⁽¹⁾.

El colágeno constituye el mejor material de soporte o andamio, para la Ingeniería de Tejidos, y puede ser modificado para obtener diferentes formas físicas como, fibras de colágeno, esponjas de colágeno, gel, películas, entre otras ^(60, 61).

El colágeno constituye una proteína común que forma parte importante del cuerpo humano o animal. El colágeno, como proteína estructural, es esencial para crear la estructura física y anatómica del organismo, de manera de mantener la morfología de los tejidos. Como un componente de la matriz extracelular, compuesta por proteínas y polisacáridos, forma un armazón de soporte sobre la cual las células se organizan. El colágeno está compuesto por tres cadenas polipeptídicas entrelazadas, constituye una proteína rígida de 300 nm de longitud y 1.5 nm de diámetro y aproximadamente 300 kilodalton (KDa) de peso molecular (Fig. 3). La molécula completa consta de 3000 aminoácidos aproximadamente ⁽¹⁵⁾.

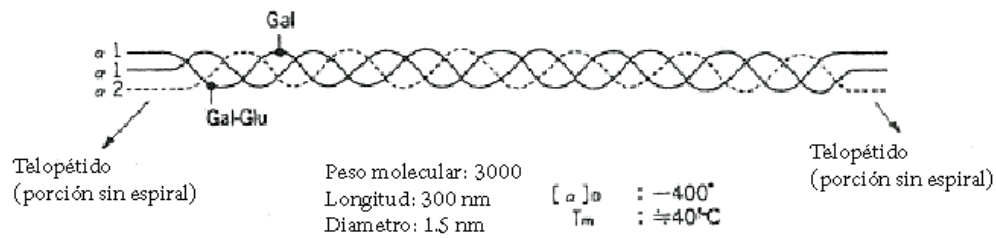


Figura 3. El colágeno como proteína estructural: parte estructural y de sustento del organismo. El colágeno como matriz extracelular: forma una estructura de soporte entre las células y está compuesto por proteínas y polisacáridos. Tomado de www.koken.com ⁽⁶²⁾.

El colágeno no se encuentra disperso como moléculas individuales alrededor de todo el organismo, sino que forma parte de estructuras altamente organizadas. Estas estructuras son diferentes dependiendo de su ubicación, sin embargo se cree que cada una se forma de la misma manera desde diferentes grados de complejidad, como se muestra en la figura 4. Además el entrecruzamiento intermolecular que ocurre entre moléculas de colágeno en estructuras altamente organizadas, permite incrementar la fuerza de los tejidos y su estabilidad térmica ^(60, 61).

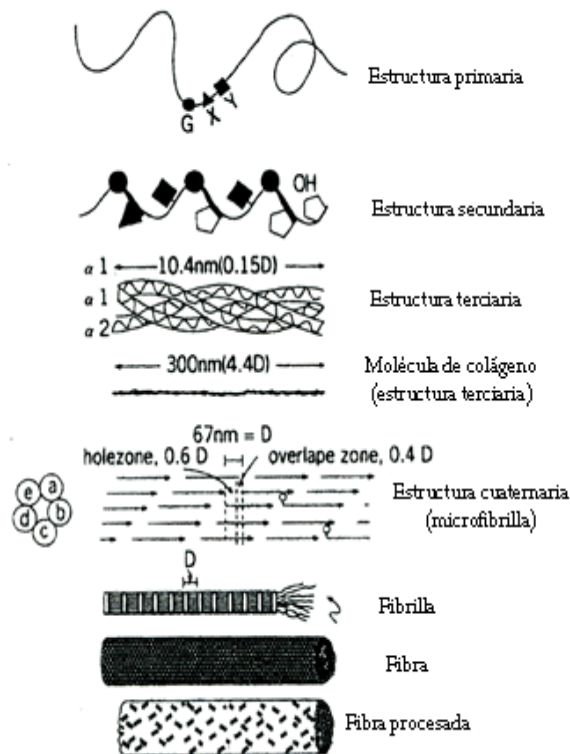


Figura 4. Proceso de formación de la molécula de colágeno, desde los diferentes grados de complejidad. Tomado de www.koken.com ⁽⁶²⁾.

El colágeno es ampliamente utilizado tanto en el campo de la salud, como en el campo investigativo. Recientemente, se ha obtenido a partir de tejidos animales, pero su elaboración es compleja, debido al fuerte entrecruzamiento intermolecular del colágeno en el organismo. Para ello, se solubiliza el colágeno utilizando proteasas, enzimas que rompen el entrecruzamiento intermolecular, como se indica en la Figura 5. El colágeno obtenido a través de esta solubilización se denomina *Atelocolágeno* ⁽¹⁵⁾.

El *Atelocolágeno*, es colágeno solubilizado a través de proteasas, pero su propiedad física es virtualmente idéntica a su forma natural, colágeno no solubilizado. Adicionalmente, el *Atelocolágeno* posee características superiores que no presenta su forma original. Se sabe que el colágeno posee muy baja antigenicidad, ya que la mayoría de las moléculas de colágeno están compuestas por una secuencia de aminoácido G-X-Y que difieren poco entre diferentes especies animales. La poca antigenicidad que presenta el colágeno es de los telopéptidos unidos a cada N-terminal de la molécula de colágeno, la cual no contiene la secuencia G-X-Y. Debido a que los telopéptidos no están presentes en el *Atelocolágeno*, su antigenicidad es aún menor que la del colágeno ⁽¹⁵⁾.

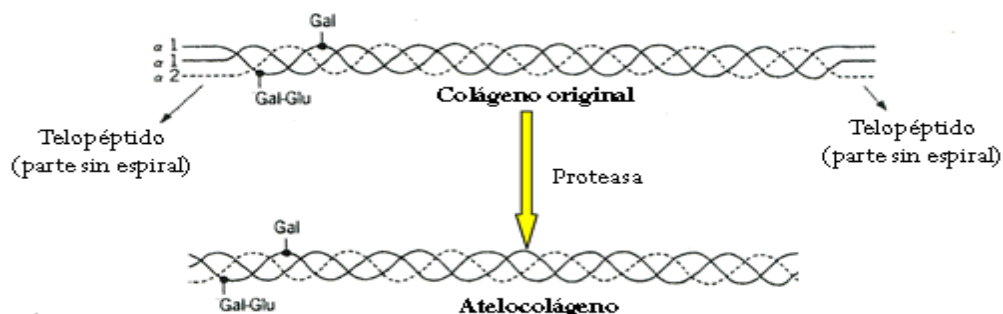


Figura 5. Solubilización de la molécula de colágeno, a través de proteasas, para generar la molécula de atelocolágeno. Tomado de www.koken.com ⁽⁶²⁾.

Otra propiedad del Atelocolágeno es ser soluble, por lo tanto desde su forma líquida puede ser modificada para generar gran variedad de presentaciones. Cuando simplemente se seca la solución, las láminas de Atelocolágeno pueden ser procesadas para generar una estructura en forma de esponja, a través del congelado al seco. También es posible obtener una presentación en forma de hilos por medio de extrusión. Polvos de Atelocolágeno, esferas y geles también son posible obtener. En este sentido, es factible utilizar las propiedades especiales del Atelocolágeno para generar la configuración más apropiada para cualquier aplicación ^(60, 61).

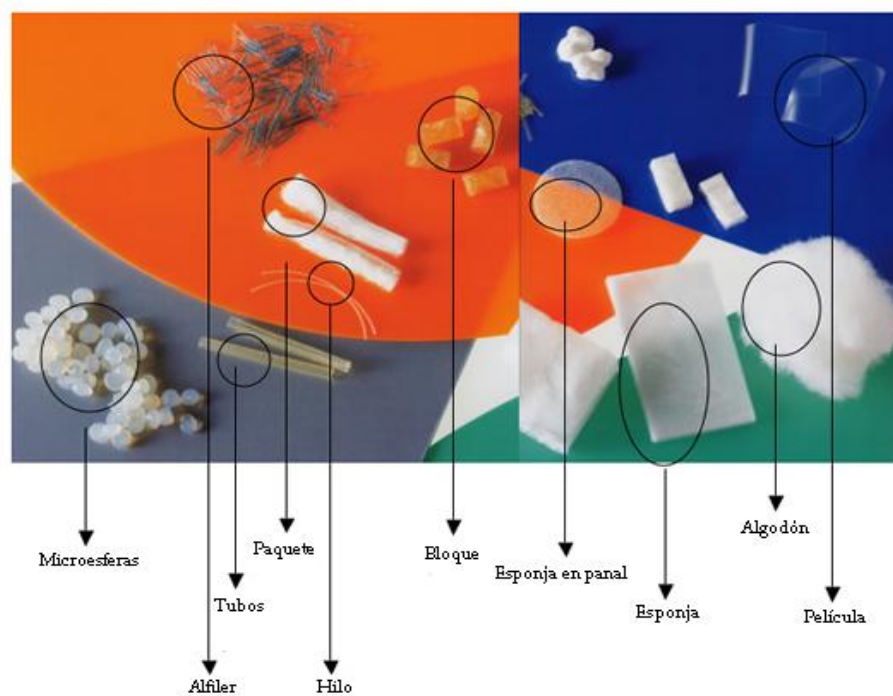


Figura 6. Diversas presentaciones de atelocolágeno, a través de diferentes métodos para mejorar sus propiedades físicas. Tomada de www.koken.com ⁽⁶²⁾.

A través de una modificación química en el Atelocolágeno, pueden ser alteradas sus propiedades físicas. Por ejemplo, el Atelocolágeno, en condiciones normales, es insoluble en agua a un pH neutro, pero esta característica puede ser alterada para hacerlo soluble en tal ambiente ^(60, 61).

Las microesferas de atelocolágeno, preparadas por la casa comercial Koken- Japan, constituyen un sustrato para el cultivo de células, preparada a partir del Atelocolágeno dérmico tipo I bovino. Pueden ser utilizadas para el cultivo de fibroblastos, de células epiteliales y de osteoblastos, posee además un período de tiempo prolongado de mantenimiento en cultivos celulares ⁽⁶²⁾.

En la literatura científica, no hemos encontrado reportes en relación al uso de MSCs humanas y plasma rico en plaquetas, en combinación con microesferas de Atelocolágeno, como soporte, para la reparación de defectos óseos de la región Buco-maxilofacial. Tampoco hemos encontrado reportes referentes al comportamiento de hMSB en cultivos con atelocolágeno, por lo cual nos pareció de interés realizar este estudio.

OBJETIVOS

Evaluar la capacidad de Células Madre Mesenquimales humanas (hMSCs) de inducir regeneración ósea al ser trasplantadas en defectos óseos de la región Buce-Maxilofacial. Inicialmente, en lo que constituiría una primera fase para lograr este objetivo, nos propusimos un modelo experimental, en el cual células madre mesenquimales (MSCs) serían aisladas a partir de médula ósea humana, expandidas, y caracterizadas en cultivo, para luego ser diferenciadas a progenitoras de tejido óseo; posteriormente ser trasplantadas en defectos óseos generados en la región mandibular de conejos. De esa manera, evaluar el proceso de osificación y regeneración ósea.

Los objetivos específicos:

- 1.-Selección y expansión de células adherentes al plástico de frascos de cultivo, a partir de muestras de médula ósea humana, usando diferentes medios y condiciones de cultivo.
- 2.-Caracterización de estas células mediante citometría de flujo, usando marcadores específicos.
- 3.-Diferenciación a células progenitoras de tejido óseo y endotelial.

- 4.-Selección de un soporte y condiciones adecuadas para el trasplante de dichas células.
- 5.-Desarrollo de la técnica quirúrgica para generar defectos óseos en el ángulo mandibular de conejos y evaluación de las condiciones adecuadas para el trasplante de estas células.
- 6.-Trasplante de las hMSC en conejos inmunosuprimidos evaluando defectos experimentales y controles.
- 8.-Evaluación del proceso de osificación y regeneración ósea en los defectos experimentales y controles, mediante evaluación radiográfica y análisis Histológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación:

Se utilizaron seis conejos New Zealand blancos adultos de 2,2 a 3,7 Kg de peso. Todos los procedimientos quirúrgicos y de cuidados postoperatorios, se realizaron bajo los protocolos de cuidado y uso de animales de laboratorio del IVIC.

Equipos:

Los equipos mayores utilizados para la realización del presente trabajo fueron:

- Centrífugas: Centrífuga modelo GLC-2B, marca Sorvall (Dupont Instruments, Newtown, Conn, USA). Centrífuga modelo Z360K, marca Hermle (LabNet. Woodbrige, NJ. USA). Centrífuga modelo A2394X-1, (International Equipment Co. Boston, Ma. USA). Microcentrífugas modelos 235B y 59, marca Fisher (Fisher Scientific. Springfield, NJ. USA).
- Incubadora de células: marca napco, modelo 5300 (Napco. Portland, Oregon, USA).

- Microscopios: Microscopio de contraste de fase modelo Standard 16, Invertoscopio modelo IM, ambos de marca Zeiss (Carl Zeiss. Oberkochen, West Germany).
- Campana de Flujo Laminar: Safeaire, Fisher Hamilton, USA
- Citómetro Becton Dickinson FACSCalibur, Biosciences and company, USA

Reactivos preparados en el laboratorio:

La preparación de los siguientes reactivos, así como todos los procedimientos que se mencionarán a continuación, fueron realizados tomando una serie de precauciones especiales que garanticen condiciones óptimas de esterilidad y en consecuencia una disminución del riesgo de contaminación por hongos y/o bacterias, lo cual comprometería los resultados del estudio. En este sentido, todos los materiales utilizados durante este trabajo (pipetas, frascos de cultivo, frascos utilizados para la preparación de medios de cultivo, placas, etc.) eran nuevos y fueron esterilizados mediante el uso de autoclave. Todos los procedimientos que estuvieron relacionados, directa o indirectamente, con el cultivo de las células fueron realizados bajo una campana de flujo laminar (Safeaire, Fisher Hamilton, USA), ubicada en el cuarto de cultivo en donde además se dispuso los principales equipos requeridos para tal fin: microscopio, centrífuga, incubadora de células y nevera. La cámara de flujo laminar, era

encendida 10 minutos antes de iniciar el trabajo, teniendo en cuidado de rociar el área de trabajo con alcohol 90%, así como también para rociar las manos del operador antes de iniciar el trabajo. En la campana de flujo laminar se mantuvo encendido un mechero, con el cual se flameó antes y después de su uso, la boca de los frascos y tubos, al igual que la punta de las pipetas de vidrio.

- Solución de Ficoll-Hypaque.

La solución de Ficoll-hypaque que se utilizó tenía una densidad de 1,077 g/ml. Para su preparación fue: 9 g. de ficoll 400 (PHARMACIA LKB; Uppsala, Sweden), se disolvieron en 113,4 ml de agua bidestilada y desionizada. Luego se añadió 28,3 ml de Hypaque sódico (WINTHROP; Products Inc., NY. USA) 50% agitando constantemente.

- Solución Salina Tamponada (PBS) (phosphate buffered saline).

Cloruro de sodio (NaCl) (MERCK, Darmstad) 8,0 g/l; Cloruro de Potasio (KCl) (MERCK, Darmstad) 0,2 g/l; fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) (MERCK, Darmstad) 1,15 g/l; fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) (MERCK, Darmstad) 0,2 g/l, disueltos en agua bidestilada y desionizada.

- **Solución anticoagulante CPD.**

Acido cítrico monohidratado ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (BDH; Chemicals Lts. Poole, England) 3,27 g/l; Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (MERCK, Darmstad) 26,3 g/l; Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 2,22 g/l; Dextrosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo. USA) 25,5 g/l, disueltos en agua bidestilada y desionizada.

- **Medios de cultivo:**

1. Medio de cultivo α MEM/Chang. (Minimum Essential Medium type α)

Como medio de base, α MEM (Gibco Invitrogen Corporation, USA) enriquecido con: 20% de suero fetal bovino para MSCs, 1% antibiótico-antimicótico (100 unidades/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin y 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anfotericina B), 18% medio Chang tipo B (IrvineScientific, USA), 2% medio Chang tipo C (IrvineScientific, USA), 1% L-glutamina (Sigma, USA)

2. Medio de cultivo de inducción osteogénica:

Este medio osteogénico es preparado con un medio de base, α MEM/Chang enriquecido, al que se le adiciona 1,8 mM de KH_2PO_4 (como fosfato inorgánico, Merck, Alemania), 100nM de

dexametasona (Sigma, USA), β -glicerol-fosfato (Sigma, USA) y 5 μ M de ácido ascórbico (Sigma, USA)

3. Medio de cultivo para crecimiento de células endoteliales (HMEC):

Consiste en medio basal endotelial tipo 2 (EBM-2, Clonetic, US&Can), suplementado con: 10% de suero fetal bovino (Gibco Invitrogen Corporation, USA), 1% solución antibiótico-antimicótico, 5% L-glutamina, 0,01% factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF, R&D Systems, USA), 2% hidrocortisona (Sigma, USA).

Obtención de Células Madre Mesenquimales (MSCs) a partir de médula ósea:

La Figura 7 muestra la metodología utilizada para la obtención, aislamiento y cultivo de las MSCs humanas. Las MSCs humanas fueron obtenidas a partir de médula ósea. Las muestras de médula ósea se obtuvieron a través de aspiración en cresta ilíaca anterior, en pacientes que requirieron cirugía traumatológica en esta área, por razones inherente a nuestro estudio, en el Servicio de Traumatología del Hospital Clínico Universitario, gracias a la cooperación del Dr. Cesar González Fuentes y

miembros de su grupo de trabajo; y en el Servicio de miembros inferiores del Hospital Ortopédico Infantil de Caracas, Venezuela, gracias a la colaboración del Dr. Ricardo Sulbarán, del Dr. Oscar Alvarado y miembros de se equipo de trabajo.

Se usaron los siguientes criterios de inclusión para la selección de los pacientes a los cuales se les tomó la muestra de médula ósea: pacientes sanos, de uno u otro sexos, edades comprendidas entre 15 y 45 años de edad, con indicación de cirugía traumatológica.

Para este estudio se seleccionaron tres pacientes, que fueron intervenidos quirúrgicamente por cirujanos traumatólogos.

Paciente número 1: Paciente masculino de 20 años de edad, a quien se le tomó muestra de contenido medular (4 ml) por aspiración a nivel de cresta ilíaca anterior, posterior a la realización de la osteotomía en dicha área, para la toma de injerto autólogo.

Paciente número 2: Paciente masculino de 15 años de edad, a quien se le tomó una muestra de médula ósea (7 ml de contenido medular) por aspiración percutánea a nivel de cresta ilíaca anterior derecha, con ayuda del Dr. Oscar Alvarado en el quirófano del Hospital ortopédico Infantil.

Paciente número 3: Paciente femenino de 46 años de edad, a quien se le tomó muestra de contenido medular (4 ml) por aspiración a nivel de cresta ilíaca anterior, posterior a la realización de la osteotomía de dicha área, para la toma de injerto autólogo, el cual fue trasplantado a nivel femoral para la corrección de una fractura en el fémur, de larga data.

La aspiración fue realizada con jeringas de 10 ml acopladas a una aguja tipo jelco número 14, para obtener la muestra del contenido medular.

El aspirado fue suspendido en 5 ml de medio para transportar la muestra al Laboratorio de Patología Celular y Molecular (LPCM) del IVIC (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas), el cual constó de: medio de cultivo α -MEM/Chang, suplementado con 1% de solución antibiótico-antimicótico y Enoxiparina (heparina de bajo peso molecular: 100 U.I./ml, Clexane®).

Para la toma de las muestras de médula ósea humana, se contó con la aprobación de los Comité de Bioética del HUC, UCV y del Hospital Ortopédico Infantil, respectivamente.

Esquema del Aislamiento y cultivo de las hMSCs

- I. Obtener el **Aspirado Medular**
- II. Re-suspender en Medio de Transporte (5 ml de medio α -MEM-Chang con antibióticos/antimicóticos)
- III. Colocar las células obtenidas de médula ósea en un gradiente de Ficoll-Hypaque →
- IV. Centrifugar a 1.800 rpm por 40 minutos a 4°C.
- V. Recuperar la capa de células en la interface de los medios y re-suspenderla en PBS.
- VI. Centrifugar a 1.800 rpm por 40 minutos a 4°C.
- VII. Re-suspender el precipitado celular en 1 ml de medio α -MEM-Chang.
- VIII. Realizar conteo total de células nucleadas (Cristal de violeta)
- IX. **Cultivo celular:** Sembrar $15-20 \times 10^6$ células nucleadas en frascos de 75 cm^2 ó $5-10 \times 10^6$ células en frascos de 25 cm^2 .
- X. Incubar a 37°C por 48 horas, en atmosfera húmeda de 95% O_2 /5% CO_2 (Sin mover).
- XI. A las 48-72 horas, constatar la presencia de células adherentes, retirando por aspiración las no adherentes.
- XII. Evaluación diaria de:
 1. Multiplicación de las células adherentes con morfología fibroblastoide.
 2. Grado de confluencia
 3. pH del medio (cambio de color del rojo fenol)
- XIII. Cambiar el medio de cultivo (2 veces por semana).
- XIV. Al alcanzar una confluencia del 70-80% (pre-confluencia), se → expande el cultivo (Pasajes). Para ello se procede a:
 - a. Trypsinización.
 - b. Re-cultivo en medio α -MEM-Chang (con 3 pasajes se alcanzó el número necesario de células para los experimentos)
- XV. **Cultivo en medios de diferenciación Osteogénica y endotelial.**
- XVI. **Implante.** →

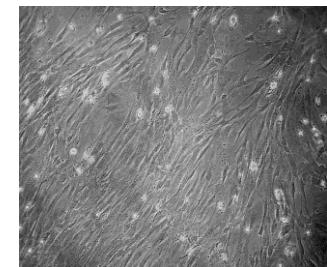
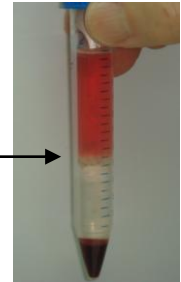


Figura 7. Descripción esquemática del procedimiento de obtención, aislamiento, cultivo y selección de las células madre mesenquimales humanas (hMSCs).

Aislamiento de Células Madre Mesenquimales a partir de médula ósea humana

Bajo la Campana de flujo laminar (Safeaire, Fisher Hamilton, USA), cada muestra de médula ósea se le agregó un volumen igual de PBS y se colocó, cuidadosamente tratando de no mezclar, sobre una capa de 5 ml de Ficoll-Hypaque (d:1.070.g/ml). Luego se centrifugó a 1.800 rpm durante 40 minutos a 4°C (Centrífuga modelo Z360K, marca Hermle (LabNet. Woodbrige, NJ. USA), recuperándose, por aspiración, la capa de células mononucleares que se formó en la interfase entre el Ficoll-Hypaque y la fase acuosa. Estas células fueron lavadas por centrifugación a 1800 rpm durante 10 minutos con PBS para eliminar el Ficoll-Hypaque. El botón celular así obtenido, fue resuspendido en 1 ml de medio α -MEM/Chang. La muestra de células fue teñida con Cristal de Violeta (tiñe las células nucleadas) en una dilución de 1:10 y contadas, en cámaras de Neubauer, en microscopio de contraste de fase.

En el caso de la muestra del paciente número 1, las células se sembraron en un frasco de cultivo de 25 cm² (T25, Cornig Star, USA) con medio de cultivo α MEM/Chang enriquecido. El frasco se incubó en una atmosfera húmeda con temperatura regulada a 37°C y concentración de CO₂ a 5% durante 48 horas, sin moverlas. Posteriormente, se mantuvo control

diario a través de observación con microscopio de contraste de fase, para determinar la presencia de células adheridas al plástico. Usualmente, entre los 3 a 5 días de cultivo, las células no adherentes fueron retiradas por aspiración suave y las células adherentes se mantuvieron en cultivo bajo las mismas condiciones. Posteriormente, los frascos de cultivos fueron examinados determinando el color del medio (pH del medio), y al microscopio para determinar la morfología celular; también el porcentaje de confluencia estimado por varios observadores. En general, se cambió el medio de cultivo 2 veces por semana o cuando se requería, tomando en cuenta el cambio de color del medio. Una vez alcanzado un 70-80% de confluencia las células fueron recultivadas para expandirlas a un número mayor (pasajes). Para la expansión celular, las células fueron enzimáticamente despegadas lavando con PBS, e incubándolas a 37 °C con 2 ml (en frascos de 75 cm²) de tripsina (0,5%) -EDTA (Na₄ 0,037 g/l de ORTHO Diagnostic Systems Inc.; Raritan, NJ. USA)). Después de asegurarse que las células se habían despegado, fueron diluidas en aproximadamente 8 volúmenes de PBS, centrifugadas a 800g por 10 minutos, luego fueron contadas, chequeada su viabilidad y recultivadas. Cada uno de estos subcultivos o pasajes permitió expandir las células a un número aproximado de 3 veces el inicial. En general, se efectuaron 3 pasajes obteniéndose, al final del último pasaje, aproximadamente 6×10^6 células. Parte de estas células fueron congeladas en medio de congelación (40% SFB, 50% medio de cultivo y 10% DMSO), pre-enfriado en agua con hielo, a una densidad de $1,2 \times 10^6$ células/ml/vial.

Otra parte de las células fueron recultivadas bajo las mismas condiciones. Posteriormente se descongeló un vial (1ml) de células y se sembraron en un frasco T25 con 6 ml de medio de cultivo α MEM/Chang enriquecido. Se realizaron 5 pasajes más, antes de ser utilizadas en el modelo in vivo experimental.

En el caso de paciente número 2, el conteo inicial de las células nucleadas en la muestra de médula ósea, fue de 17×10^6 células. Fueron sembradas en un frasco de cultivo de 75 cm^2 (T75, Corning Star, USA) con medio de cultivo α -MEM /Chang enriquecido, se incubaron a 37°C , en una atmosfera húmeda que contenía 95% de O_2 y 5% de CO_2 , durante 48 horas, sin moverlas. Posteriormente, se mantuvo control diario a través de observación con microscopio de luz, para determinar la presencia de células adheridas al plástico del frasco, el porcentaje de confluencia y las características morfológicas de las células. El medio de cultivo se cambió 2 veces por semana hasta que las células alcanzaron 70% de confluencia, lo que se logró en aproximadamente 15 días. En ese momento, las células fueron tripsinizadas, para despegarlas, enzimáticamente, del plástico del frasco y poder ser sembradas nuevamente en varios frascos para su expansión. Así, se eliminó el sobrenadante (conteniendo las células no adheridas) de cada placa y se lavó con PBS. Se añadió 4 a 5 ml de Tripsina (0,5%) -EDTA (Na_4 0,037 g/l de ORTHO Diagnostic Systems Inc.;

Raritan, NJ. USA) a cada placa, se incubaron durante 5 minutos a 37°C y se observaron al microscopía de luz para verificar que estuviesen despegadas todas las células. Luego se transfirieron a tubos Falcon de 15 ml y se les añadió PBS hasta llegar a 12 o 13 ml. Se centrifugó a 1.400 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en medio de cultivo α -MEM/Chang enriquecido. Se contaron las células con Azul de Tripano (solo las células vivas excluyen este colorante) para verificar viabilidad y se sembraron en varias placas T75.

En el caso del paciente número 3, al conteo inicial se obtuvieron 10×10^6 células. Fueron sembradas en un frasco de cultivo de 25 cm² (T25, Corning Star, USA) con 5 ml de medio de cultivo α -MEM /Chang enriquecido, se incubaron a 37°C, en una atmosfera húmeda que contenía 95% de O₂ y 5% de CO₂, durante 48 horas, sin moverlas. Posteriormente se realizó, el mismo procedimiento de las muestras anteriores, para su expansión. A su tercer pasaje y 17 días previos a su utilización en el modelo in vivo experimental, se colocaron las células en 2 frascos T75 en medio osteogénico y 2 frascos T75 en medio de cultivo para crecimiento de células endoteliales (HMEC).

En todos los casos, se tomó una alícuota de las células y se sembraron con medio osteogénico, en una placa de 24 pozos (Greiner Bio-One, USA), para realizar estudios in vitro del proceso de osteogénesis (ver Figura 13 de resultados)

Selección del material de soporte, preparación de las hMSC para el trasplante en conejos y esquema de implantación:

En experimentos anteriores, utilizando células madre proveniente de líquido amniótico humano (hAFSC), realizados en el laboratorio de Patología Celular y molecular del Centro de Medicina Experimental del IVIC, se determinó que estas células crecen de manera óptima en atelocolágeno líquido y en microesferas de atelocolágeno (ambos productos de Koken, Japon). De esta forma, las hAFSC fueron incluidas en un coagulo de plasma rico en plaquetas para ser trasplantadas en ratones inmunosuprimidos (con Ciclosporina,) y determinar los tejidos generados en el ratón al cabo de un período de tiempo (Romano, Cardier, Witting y colaboradores, datos no publicados). Por ello se pensó, que un enfoque similar podría ser empleado en estudios con hMSC. Así, en estudios previos se determinó que las hMSC provenientes de medula ósea, al igual que las hAFSC, crecen de manera adecuada sobre atelocolágeno y sobre microesferas del mismo material.

En el presente estudio, cuando las hMSCs alcanzaron la confluencia deseada (70-80%) y 72 horas antes de realizar la cirugía en los conejos número 1 y 2, se tripsinizaron las células para despegarlas de los frascos de cultivo. Una vez lavadas y obtenido el pellet de células, se contó el total de las células presentes y se procedió a sembrarlas en suspensión con las de microesferas de atelocolágeno (soporte para las hMSCs), en tubo de 5ml. Se colocaron 250 µl de microesferas de atelocolágeno (Koken, Japan) con $1,25 \times 10^6$ células, provenientes de médula ósea del paciente número 1, en cada tubo y se le añadió medio osteogénico. A los 9 días previos del procedimiento quirúrgico en el conejo número 3, las células del paciente número 1 ($1,25 \times 10^6$ células), se cultivaron en suspensión con 250 µl de las microesferas de atelocolágeno y se añadió medio osteogénico

Con las células del paciente número 2 ($0,4 \times 10^6$ células en total), se colocaron con 250 µl de microesferas de atelocolágeno y medio osteogénico, 72 horas antes de realizar la intervención quirúrgica en el conejo número 4.

Una fracción de las células del paciente número 3, fueron cultivadas, durante una primera fase, en un medio osteogénico y otra fracción en medio de cultivo para crecimiento de células endoteliales (HMEC), durante 5 días. Posteriormente, las células provenientes de cada uno de los cultivo mencionados, se sembraron juntas (1×10^6 células en total), en una mezcla

de 3 volúmenes de medio osteogénico y un volumen de medio de cultivo para crecimiento de células endoteliales (HMEC), con 250 µl de microesferas de atelocolágeno, 13 días antes de realizar la intervención quirúrgica en los conejo número 5 y 6.

El siguiente cuadro muestra, de manera resumida, el esquema utilizado para cultivar y diferenciar las hMCSs provenientes de cada paciente (1, 2 y 3) antes del procedimiento de implantación:

hMSCs	Conejos					
	1	2	3	4	5	6
Paciente 1	2 días en medio Osteogénico incluidas en PRP de conejo	2 días en medio Osteogénico incluidas en PRP de conejo	9 días en medio Osteogénico incluidas en PRP de conejo	-	-	-
Paciente 2	-	-	-	2 días en medio Osteogénico incluidas en PRP de conejo	-	-
Paciente 3	-	-	-	-	Co-cultivo durante 18 días en medio Osteogénico + medio endotelial incluidas en PRP humano	Co-cultivo durante 18 días en medio Osteogénico + medio endotelial incluidas en PRP humano

Estudios de expresión de marcadores de superficie en las hMSCs, mediante Citometría de Flujo

Células derivadas de médula ósea humana, fueron evaluadas para determinar la expresión de marcadores de superficie de MSCs, mediante Citometría de Flujo. Para ello, las células previamente cultivadas (de los pacientes número 1, 2 y 3) fueron colectadas mediante tripzinización. Posterior a los lavados correspondientes, se resuspendieron en PBS/albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1% y fueron colocadas en viales de microcentrífuga (Standard Tips, Eppendorf, Alemania), a los cuales se les adicionó anticuerpos monoclonales (conjugados a FITC o PE o PercP) de ratón dirigidos contra los siguientes marcadores humanos: CD90, CD73, CD54, CD56, CD49e, CD49c, CD49b, CD29, CD166, CD62p, CD34, CD45, CD51/CD61 y HLA (todos estos anticuerpos fueron adquiridos en Pharminogen, Becton Dickinson, USA). Cada vial con sus respectivos anticuerpos fueron incubados 30 minutos en frío, protegidos de la luz. Posteriormente cada vial fue lavado y resuspendido en PBS/BSA al 0,1% y finalmente, analizados en el citómetro de flujo. El análisis de la expresión de los marcadores fue realizado mediante el programa Cell Quest (Becton Dickinson, USA). Como control negativo se incubaron las hMSCs con los respectivos isotipos.

Análisis morfológico de las células:

Durante todo el período de cultivo, la morfología celular se observó bajo el microscopio de contraste de fases, tanto para el momento de realizar los diferentes pasajes celulares, como al momento de inducir las células en medio osteogénico y en medio de cultivo para crecimiento de células endoteliales (HMEC). También se evaluaron al microscopio, las células diferenciadas, para determinar la producción de material osteoide in vitro.

En muestras de cultivos celulares, se aspiró el medio de cultivo sobrenadante, se procedió a fijar con 4% paraformaldehído pH 7.0 y se realizó tinción de los cultivos celulares, que se encontraban en conjunto con las microesferas de atelocolágeno en medio osteogénico; con Alizarina (para observar depósitos de calcio) y con azul de alcian para observar la producción de proteoglicanos. La morfología celular se visualizó con Wright-Giemsa.

Preparación del Plasma rico en plaquetas:

El PRP utilizado en este estudio fue preparado de acuerdo a protocolos previos ^(14, 45, 63), ajustado para el uso de la sangre de los conejos. Las plaquetas fueron obtenidas de sangre venosa del conejo (8 ml). La sangre obtenida se colocó con 2 ml de citrato fosfato dextrosa (CPD) y se

centrifugó dos veces, la primera a 1000 rpm durante 20 minutos a 20°C, para remover los glóbulos rojos y glóbulos blancos. El sobrenadante constituye el plasma rico en plaquetas o PRP. Luego se centrifugó una segunda vez a 1600 rpm durante 10 minutos para concentrar aun más las plaquetas. El pellet obtenido, es de plaquetas y el sobrenadante es el plasma pobre en plaquetas (PPP). Se eliminó la mitad del PPP y se resuspendieron las plaquetas de manera que quedaran en un PRP mas concentradas.

Se les quitó el sobrenadante a los tubos de 5ml con las hMSCs expandidas y las microesferas previamente sembradas, de manera que solo quedaran las células junto con las microesferas de colágeno, se le añadió 100 µl del PRP, 20 a 30 µl de cloruro de calcio al 5% y 20 a 30 µl de trombina (100 U.I./ml), para así formar un coagulo. Este procedimiento se realizó inmediatamente antes de la cirugía en conejos.

Protocolo quirúrgico y postquirúrgico:

Todas las cirugías fueron llevadas a cabo bajo condiciones de asepsia. Cada conejo recibió anestesia general utilizando una combinación de Ketamina (Ketalar®, Parke-Davis) (50 mg/Kg peso intramuscular) y Xylazina (Rompún®, Bayer) (10mg/Kg peso intramuscular) ^(64, 66). Después de haber afeitado y desinfectado la piel del área a intervenir y bajo anestesia local con lidocaína 2%, epinefrina 1:100000 (New Stetic, BPM Invima Colombia), se

realizó una incisión mesiodistal (de 4mm aproximadamente, coronal al borde posterior de la rama mandibular) a cada lado del borde inferior de la mandíbula de cada conejo. Posterior a la exposición y disección del músculo masetero, con ayuda del electrobisturí, se expuso la porción ósea de la región anterior del ángulo mandibular, separando el periostio bucal y lingualmente. Bajo constante irrigación con solución salina y con una fresa a baja velocidad, se creó un defecto óseo estandarizado (con la ayuda de una guía estándar), de 5mm de diámetro en la porción anterior del ángulo mandibular. El diámetro escogido corresponde al tamaño crítico de los defectos óseos en modelos animales experimentales desarrollado en conejos y que ha sido reportado como el tamaño para los defectos óseos que previene la cicatrización espontánea durante la vida del animal ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾.

El defecto en uno de los lados de la mandíbula de los conejos (lado experimental), se colocó un coagulo formado por PRP, microesferas de colágeno y las hMSCs, previamente cultivadas y expandidas. Luego fue cubierto por una membrana de colágeno reabsorbible de regeneración tisular, la cual fue cortada para cubrir 3 a 4 mm de los bordes del defecto, y colocada debajo del periostio. Después los tejidos blando fueron reposicionados y suturados por capas con sutura reabsorbible 3-0 (ver Figura 8). En el ángulo mandibular contralateral (lado control), se realizó el mismo procedimiento a diferencia que el coagulo implantado en el defecto óseo, únicamente estaba formado por PRP y microesferas de colágeno (sin las

hMSCs). Cada conejo recibió una inyección intramuscular de penicilina procaínica (Pronapen®, 40000 U.I./día) y diclofenac sódico (Diclofenac sódico®, Genven. 4 mg/día) durante 5 días posterior a la cirugía. También se les colocó Ciclosporina intraperitoneal (Sandimmune® Novartis), 5mg diarios durante todo el período post-implante, hasta el sacrificio de los animales

Dos de conejos fueron sacrificados a las 4 semanas postoperatorias (conejos 5 y 6). Cuatro de ellos, a las 8 semanas posterior a la intervención quirúrgica (conejos 1, 2, 3, y 4).

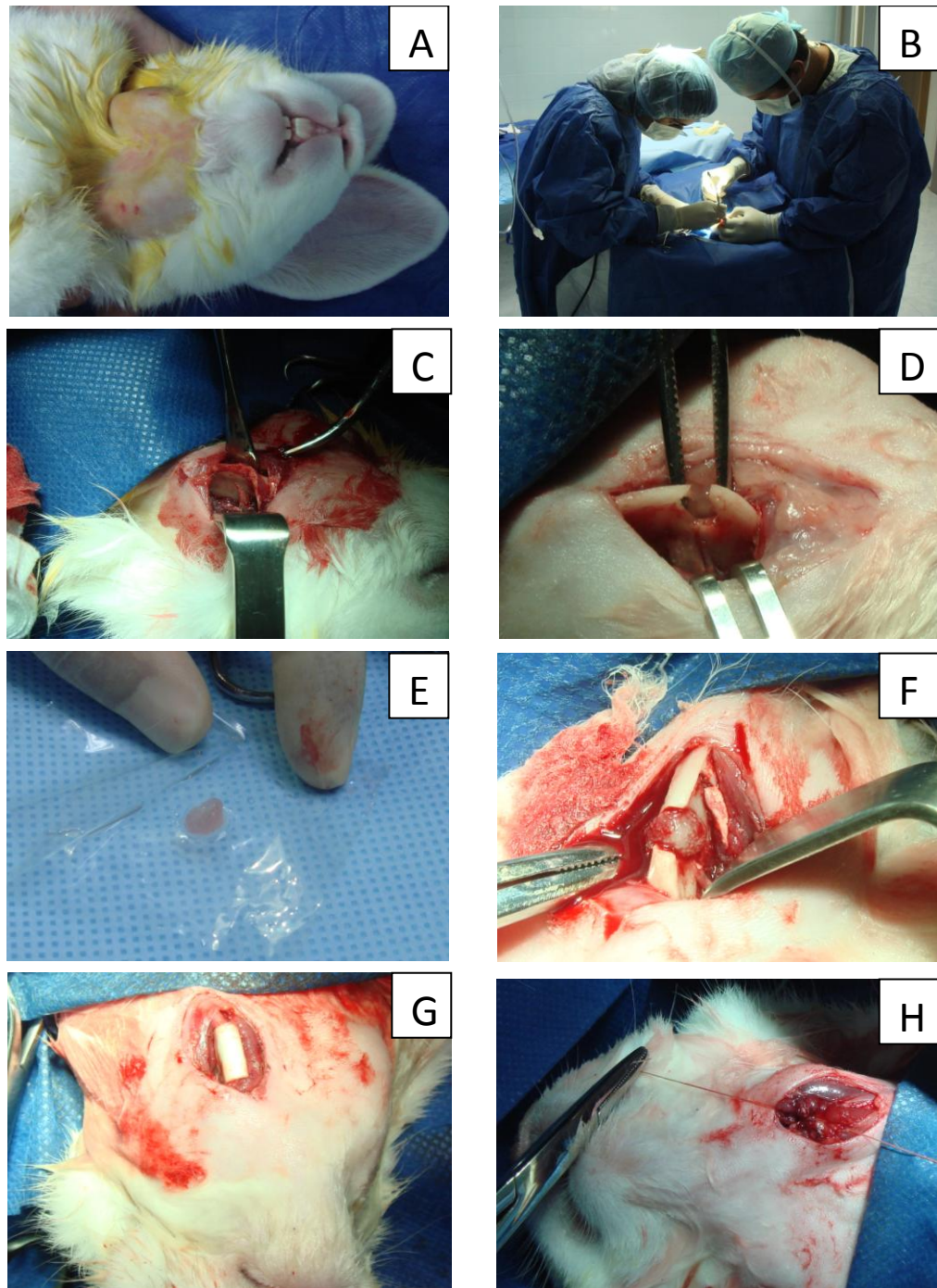


Figura 8. Procedimiento quirúrgico para el desarrollo del defecto óseo y la implantación de células madre mesenquimales humanas (hMSCs). A. Preparación de la región mandibular. B. Cirujanos y área quirúrgica. C. Exposición del ángulo mandibular. D. Defecto óseo de tamaño crítico. E. Coagulo de plasma rico en plaqueta y microesferas de colágeno, conteniendo las hMSCs. F. Colocación

Preparación del espécimen para estudios histológico y estudios radiográficos:

Los conejos 1, 2, 3 y 4 fueron sacrificados a las 8 semanas post-implantación, mientras que los conejos 5 y 6 se sacrificaron a las 4 semanas post-implantación. Los animales fueron inmovilizados para la aplicación de una solución concentrada de anestésicos no inhalantes tipo barbitúricos, Pentobarbital Sódico y Fenilhidantoína (200 mg/ml, Eutanex®, Intervet), a dosis de 1 ml/5 kg de peso, vía intravenosa, a nivel de la vena marginal de la oreja. A continuación, se verificaron los signos vitales para comprobar la muerte del animal ^(64, 65). Luego se procedió a disecar la mandíbula de cada conejo, eliminando los tejidos blandos y separándola de las articulaciones temporo-mandibulares. Se realizó la sección de cada hemimandíbula a nivel de la sínfisis mentoniana y fueron sumergidos en formol tamponado al 10%. A cada hemimandíbula, se le realizó un estudio radiográfico (ver observación radiográfica en resultados).

Posteriormente, se seccionó un bloque, de 2-3 cm de longitud, en cada ángulo mandibular, alrededor del área donde fueron realizados los defectos óseos. Los bloques mandibulares obtenidos, fueron sumergidos nuevamente en formol tamponado al 10% para su fijación y preparación histológica.

Los bloques mandibulares, fueron descalcificados en solución descalcificante rápida para histología (Osteomol. Merck, Darmstadt, Germany) durante 4 días. Luego se seccionaron para su inclusión en parafina y se obtuvieron los bloques, a los que se les realizó cortes de 3 μ m de grosor, en sentido vestíbulo-lingual, perpendicular a la superficie externa de la mandíbula. Se obtuvo un total de 3 secciones consecutivas para cada muestra. Fueron colorearon con hematoxilina-eosina y posteriormente se realizaron coloraciones de histoquímica utilizando azul de toulidina, para ser analizados al microscopio de luz de doble visión (BX41, Olympus, Melville, NY). Los datos fueron colectados en una base de datos, diseñada para el análisis estadístico (ver tablas I).

Evaluación radiográfica:

En una primera fase, a la cuarta semana post-quirúrgica, se realizó la evaluación radiográfica de los conejos 1, 2, 3 y 4, mediante la toma de radiografías latero-mandibulares con placas oclusales (Kodak), bajo anestesia intramuscular con Ketamina (Ketalar®; 30mg/Kg peso) y Xylazina (Rompún®; 5mg/Kg peso).

En una segunda fase, una vez sacrificados todos los conejos y obtenidos los especímenes de la hemimandíbula de cada uno, se les realizó un estudio radiográfico, mediante la toma radiográfica del área a analizar. Se

colocó el espécimen y la fuente de rayos-X totalmente perpendicular a una placa oclusal (Kodak), de manera de obtener una imagen definida, con la menor magnificación posible y así poder realizar comparaciones más precisas, entre los defectos experimental y control.

RESULTADOS

Aislamiento y cultivo de las hMSCs

Las hMSCs fueron aisladas de médula ósea de tres pacientes entre 15 y 45 años de edad (ver Figura 7). Después de 48 horas de cultivo, las células de médula ósea, resuspendidas en medio α MEM/Chang, formaron colonias parecidas a fibroblastos, con capacidad de adherirse al plástico de las placas y frascos de cultivos. Las células adherentes proliferaron rápidamente. Después de 1 mes de cultivo y de varios pasajes, estas células fueron expandidas alcanzando el número total de células necesarias para ser utilizadas en el modelo experimental in vivo. En la Figura 9 se presenta una muestra de estas células. Nótese el grado de confluencia entre las células en cultivo y su forma alargada, parecidas a fibroblastos.

Identificación de hMSCs mediante Citometría de flujo

Las hMSCs se identificaron mediante la detección de la expresión de marcadores de superficie. Las células adherentes aisladas de médula ósea, cultivadas y expandidas, fueron evaluadas, mediante la técnica de Citometría de Flujo, en cuanto a la expresión o no de los siguientes marcadores CD34, CD45, CD90, CD73, CD54, CD56, CD49e, CD49c,

CD49b, CD49d, CD29, CD166, CD51/CD61, CD62p, CD117, CD11a, CD31, CD36, CD106, CD15, CD80, CD133, receptor tipo-2 del factor de crecimiento vascular-endotelial, VEGF-R2, anticuerpo monoclonal KDR (ver figura 11) y HLA (antígenos de histocompatibilidad).

En la Figura 10 y 11, se presentan los resultados de los marcadores citados sobre las células estudiadas. Puede apreciarse la positividad para los marcadores CD90, CD73, CD166, CD49e, CD56, CD29 y la negatividad para los marcadores CD34, CD45, CD11a. Esto permite concluir que las células expandidas presentan características de células madre mesenquimales y no de células hematopoyéticas.

En el caso del paciente número 1, se determinó la presencia de CD90 (99%), CD73 (98%), CD56 (10%), CD166 (30%), CD49e (98%), CD29 (88%) y HLA (1%); previo a su utilización en el modelo experimental in vivo. En el caso del paciente número 2, se determinó la presencia de CD90 (99%), CD73 (99%), CD56 (87%), CD166 (99%), CD49e (99%), CD29 (99%) y HLA (8%), antes de implantar estas MSCs en el modelo animal. En el caso del paciente número 3, se determinó la presencia de CD90 (99%), CD73 (99%), CD56 (69%), CD166 (99%), CD49e (99%), CD29 (99%) y HLA (6%), antes de utilizar MSCs en el modelo animal (ver Figura 11).

Estos resultados indican que, las MSCs provenientes de médula ósea, de las muestras tomadas de los pacientes 1, 2 y 3, expresaron de manera evidente marcadores de superficie específicos de MSCs. También, es importante destacar que no expresaron marcadores hematopoyéticos, tales como CD45, CD34 y CD11a ^(1, 27, 70).

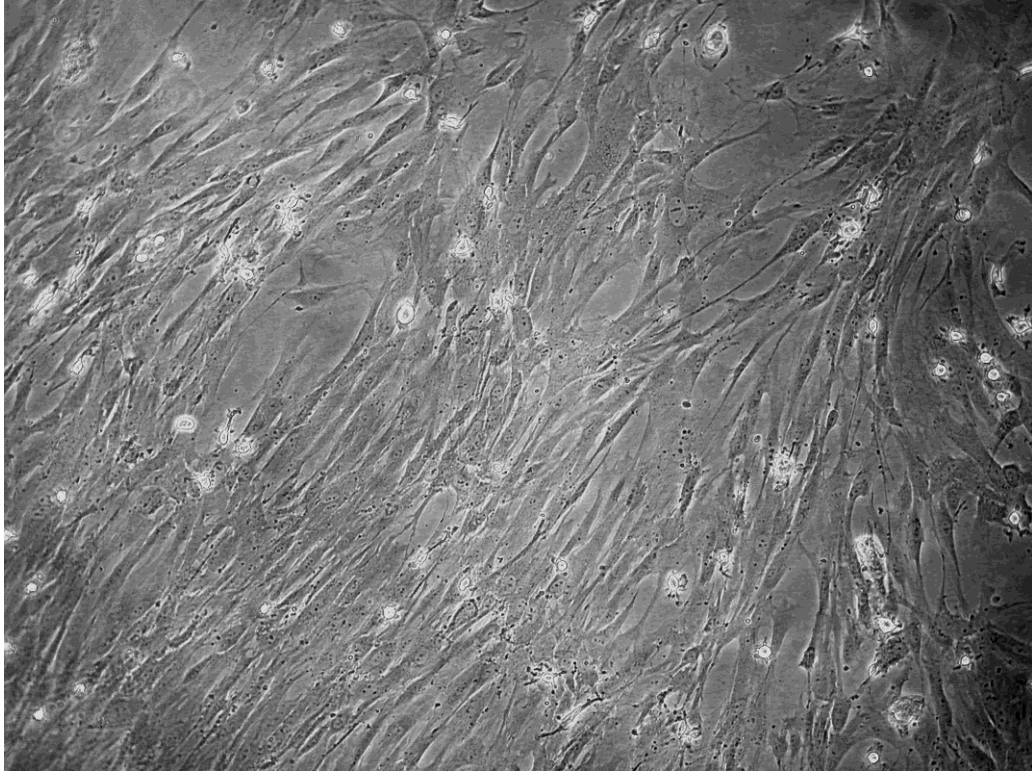


Figura 9. Microfotografía de cultivo de células provenientes de médula ósea humana en medio de cultivo α MEM/Chang después de 15 días de cultivo. Se observa la presencia de células morfológicamente parecidas a fibroblastos con una confluencia aproximada de 70-80% (Magnificación: 20x).

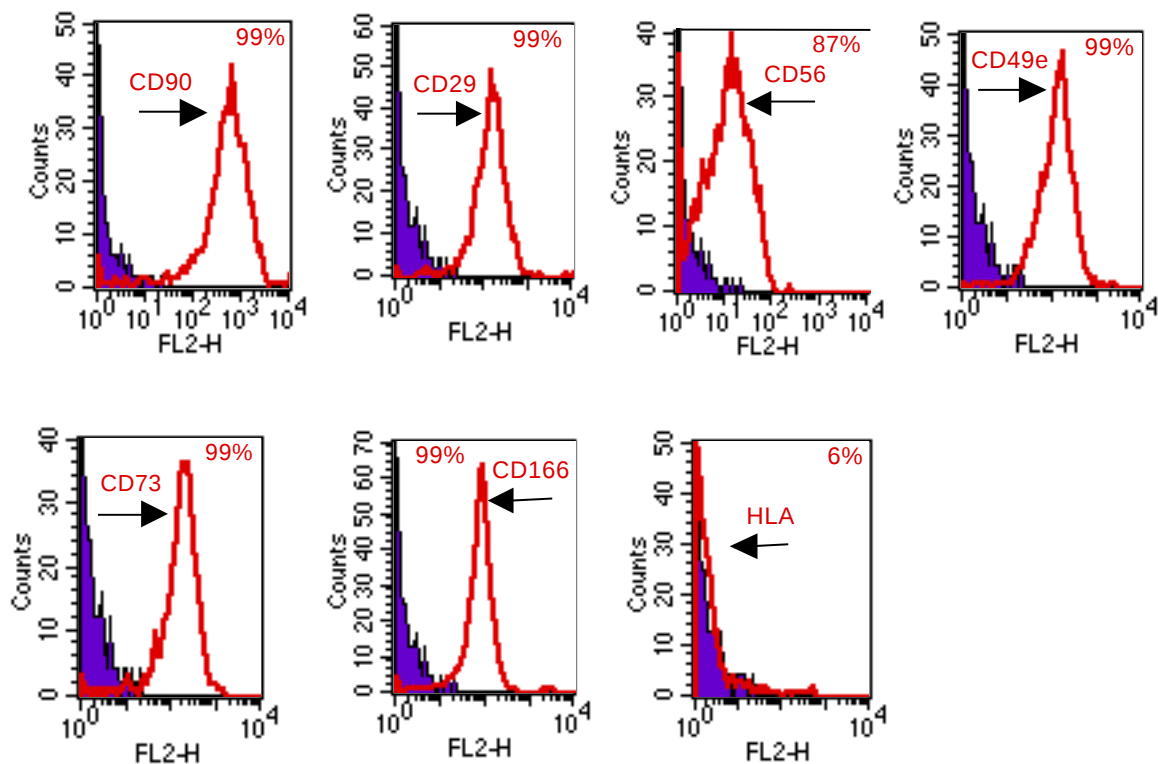


Figura 10. Estudio de expresión de marcadores de superficie en hMSCs. La expresión de marcadores de células madre mesenquimales (MSCs) fueron evaluados, mediante citometría de flujo, en células cultivadas y expendidas, provenientes de médula ósea humana de los pacientes 1, 2 y 3. El porcentaje en los histogramas representan el número de células que expresaron los marcadores para MSCs. Se observa la presencia de células CD90 +, CD56 +, CD73 +, CD49e +, CD29 +, CD166 + y la limitada expresión de otros marcadores como HLA, CD34, CD45, CD133, CD117 entre otros, (no mostrado en esta figura) indicando por estas características, la presencia de MSCs en los cultivos de las células obtenidas. Este análisis fue realizado a las células antes de ser re-cultivadas en medios de diferenciación. Todas las hMSCs, provenientes de las muestras de médula ósea, expresaron los marcadores mencionados de manera similar.

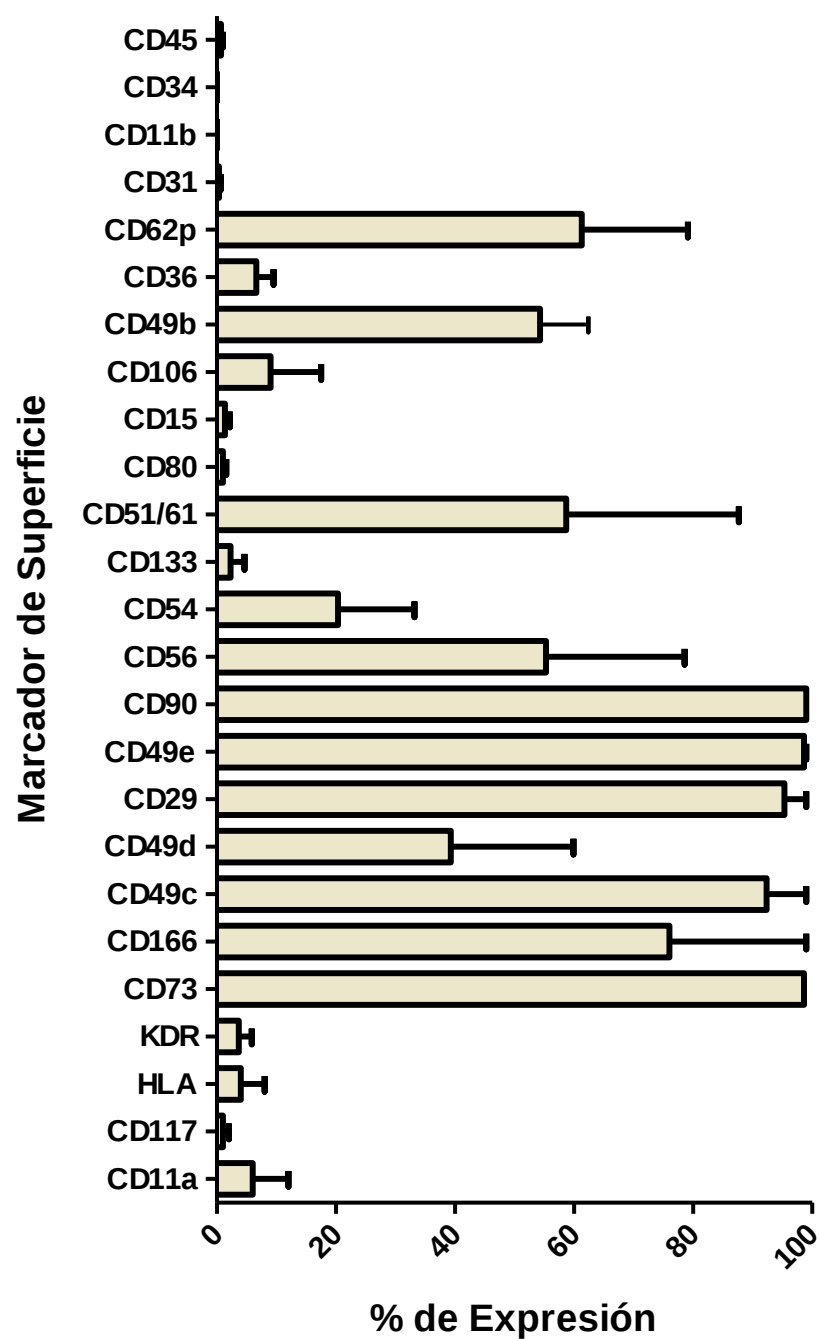


Figure 11. Expresión de diferentes marcadores de superficie en las células mesenquimales aisladas, cultivadas y expandidas provenientes de médula ósea humana. Los resultados son la media $\pm$ ESM de 3 donantes.

Inducción in vitro de las hMSCs hacia células progenitoras

osteogénicas:

Las MSCs poseen la capacidad de diferenciarse hacia diferentes tipos de células especializadas, de acuerdo al microambiente en el que se desarrollen. Las MSCs humanas, al ser colocadas en un medio Osteogénico tendrían la capacidad de diferenciarse hacia células progenitoras osteogénicas, con la habilidad de producir núcleos de mineralización. Por esta razón, las hMSCs previamente cultivadas y expandidas en medio α MEM/Chang, fueron re-cultivadas en un medio osteogénico para inducir su diferenciación a células capaces de producir núcleos de mineralización e iniciar el proceso de osteogénesis (en progenitoras osteoblásticas y en osteoblastos).

Las células provenientes de los pacientes 1 y 2, fueron cultivadas en medio osteogénico, con la adición de microesferas de colágeno, durante 48 horas antes de ser implantadas en el modelo experimental. Las células obtenidas del paciente 3 fueron cultivadas en medio osteogénico, sin microesferas de colágeno, durante 18 días antes de ser implantadas. Las microesferas solo fueron añadidas 13 días antes de la implantación.

La Figura 12 muestra las hMSCs cultivadas en medio osteogénico durante 9 días, conteniendo microesferas de atelocolágeno. Se observa

como las hMSCs se distribuyeron y adherieron a la superficie tridimensional de las microesferas, confirmando la capacidad de las hMSCs de adherirse a la superficie de las microesferas de atelocolágeno utilizadas como soporte. Además, las células expandidas cambiaron su morfología, a células más grandes y con una forma más poligonal.

La diferenciación osteoblástica se puso en evidencia, mediante la formación de núcleos de mineralización en el cultivo. Estos núcleos fueron reconocidos mediante la tinción con rojo de alizarina, colorante que se fija específicamente a los depósitos de calcio. Como se muestra en la Figura 13, estas células sintetizaron y secretaron matriz extracelular con depósitos de calcio en las placas de cultivo. Adicionalmente, las células cultivadas formaron agregados irregulares, en su mayoría asociados a grupos de células, pudiendo ser reconocidas como compuestos ricos en calcio por su intensa coloración roja con alizarina. Estos resultados sugieren la diferenciación hacia un linaje osteogénico, a los 15 días de cultivo en medio osteogénico.

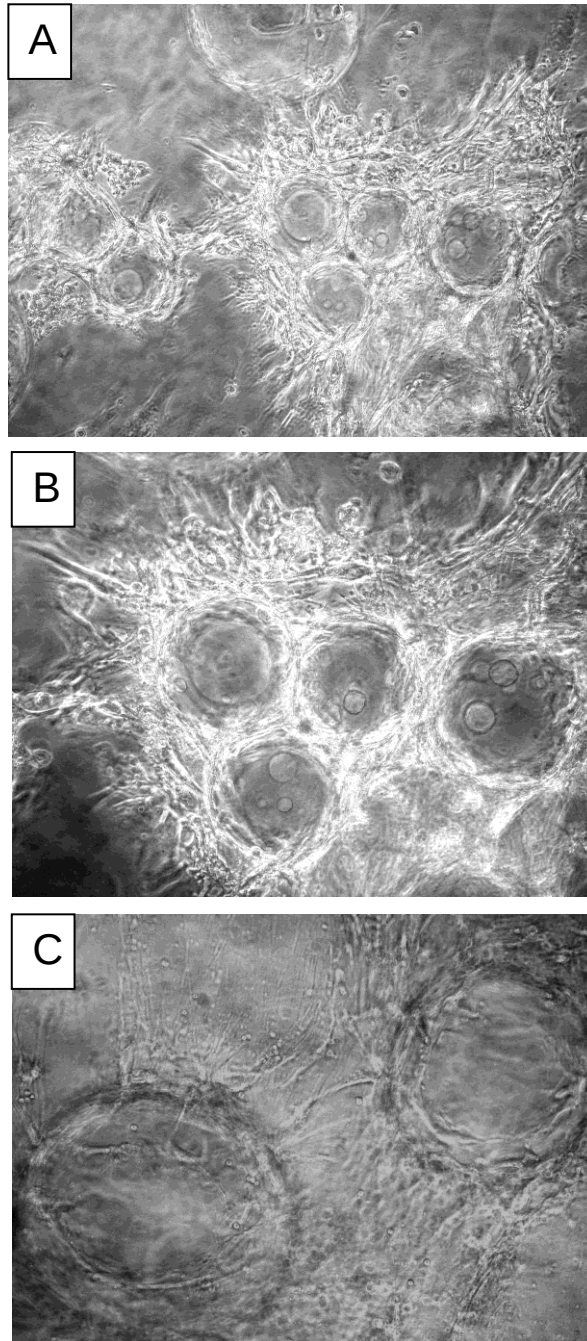


Figura 12. Células madre mesenquimales humanas en suspensión con las microesferas de colágeno a los 9 días de cultivo con medio osteogénico. Las hMSCs del paciente número 1 (colocadas en los defectos experimentales de los conejos número 1 y 2) en suspensión con microesferas de colágeno, a los 9 días de cultivo con medio osteogénico. Nótese la capacidad de las células de adherirse a toda la superficie tridimensional de las microesferas de colágeno (soporte) y el cambio de morfología celular. Magnificación: 10x (A); 20x (B)) y 40x (C).

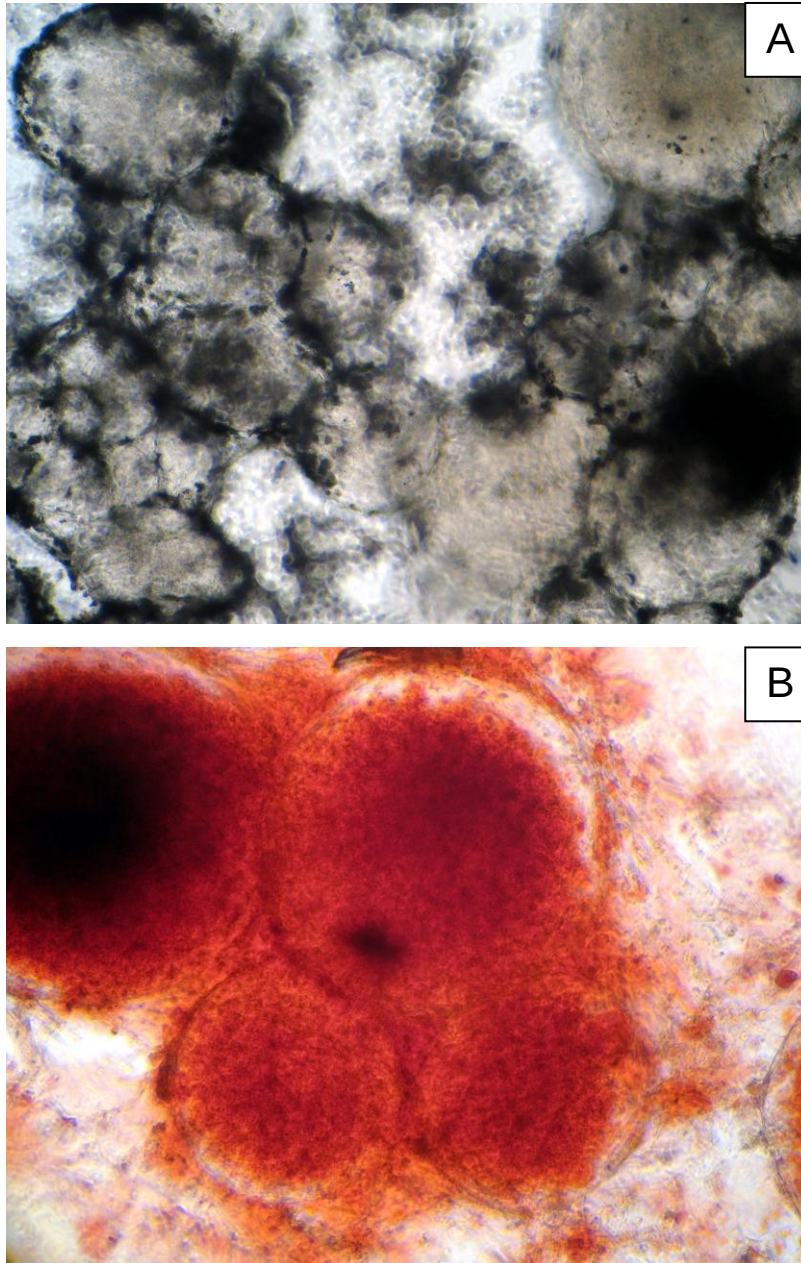


Figura 13. Células madre mesenquimales humanas en suspensión con las microesferas de colágeno a los 17 días de cultivo con medio osteogénico, teñidas con rojo alizarina. Las hMSCs del paciente número 1 (colocadas en los defectos experimentales de los conejos número 1 y 2) en suspensión con microesferas de colágeno, a los 17 días de cultivo en medio osteogénico. Nótese la formación de núcleos de mineralización alrededor de las microesferas de colágeno (A). La coloración positiva al rojo alizarina, demuestra la producción de depósitos de calcio alrededor de las microesferas de colágeno (B). Magnificación: 20x.

Inducción in vitro de las hMSCs hacia células progenitoras endoteliales:

Las hMSCs cultivadas, al ser colocadas en un medio de cultivo para crecimiento de células endoteliales (HMEC), mostraron la capacidad de diferenciarse hacia células endoteliales. La diferenciación se evaluó mediante la expresión de marcadores de superficie para precursores de células endoteliales (receptor tipo-2 del factor de crecimiento vascular-endotelial, VEGF-R2, anticuerpo monoclonal KDR), CD34, CD133, y por su capacidad de formar estructuras circulares semejantes a vasos sanguíneos en cultivo (células con características morfológicas semejantes a células endoteliales).

Las hMSCs cultivadas y expandidas en medio HMEC, fueron recultivadas en un tubo para cultivo, conjuntamente con las hMSCs crecidas y cultivadas en medio osteogénico, en proporción 1:3, usando como medio de cultivo una mezcla de 3 volúmenes de medio osteogénico y 1 volumen de medio HMEC. Estas células fueron cultivadas en conjunto con microesferas de atelocolageno durante 13 días antes de su implantación.

Esquema de Implantación de las hMSCs.

Los animales experimentales, a los que se les practicó el procedimiento quirúrgico, se les implantaron las hMSCs, tal como se describió en Materiales y Métodos, de acuerdo al siguiente esquema:

Origen de las hMSCs	Conejos					
	1	2	3	4	5	6
Paciente 1	2 días en medio Osteogénico incluidas en PRP de conejo	2 días en medio Osteogénico incluidas en PRP de conejo	9 días en medio Osteogénico incluidas en PRP de conejo	-	-	-
Paciente 2	-	-	-	2 días en medio Osteogénico incluidas en PRP de conejo	-	-
Paciente 3	-	-	-	-	Co-cultivo durante 18 días en medio Osteogénico + medio endotelial incluidas en PRP humano	Co-cultivo durante 18 días en medio Osteogénico + medio endotelial incluidas en PRP humano

El análisis de los resultados se presentarán en general, siguiendo este esquema.

Observación clínica:

Los seis conejos toleraron bien el procedimiento quirúrgico y se mantuvieron saludables, ganando peso corporal durante la fase postoperatoria. Posterior a los 7 días de la intervención quirúrgica, los animales mostraron limitados signos de inflamación local, todas las heridas se mantuvieron cerradas y no presentaron signos de exposición del material implantado durante el período de cicatrización.

Análisis macroscópico, radiográfico e histológico de los especímenes:

Los animales fueron sacrificados y se disecó la mandíbula completa de cada uno de ellos, obteniéndose especímenes mandibulares bilaterales. Cada hemimandíbula fue fijada en formol, examinada macroscópicamente y sometida a evaluación radiográfica. Posteriormente, se seccionó un bloque de 2-3 cm, de cada ángulo mandibular, alrededor del área en donde fue realizado el defecto óseo, para su estudio histológico. Los resultados de estas observaciones se presentan a continuación

Observación macroscópica

La evaluación macroscópica de los especímenes obtenidos de los conejos 1 y 2 se realizó a las 8 semanas post-implantación. A estos

animales se les implantó células del paciente número 1, diferenciadas en medio osteogénico durante 48 horas, combinadas con las microesferas de colágeno y PRP de conejo. Se utilizó un control contra-lateral al que se le mantuvo las mismas condiciones de implantación, pero sin las hMSCs. Bajo estas condiciones experimentales, se observó que el defecto del conejo 1, donde se había implantado las hMSCs, aparentemente, no cicatrizó por completo. En el defecto óseo control se notó una aparente mayor cicatrización ósea, en comparación con el defecto donde se implantaron las hMSCs. Estas mismas observaciones, se presentaron en los especímenes obtenidos del conejo número 4, al que se le implantó hMSCs del paciente número 2, en las mismas condiciones de los conejos 1 y 2.

Bajo las condiciones experimentales descritas para el conejo número 2, se observó que el defecto donde se habían implantado las hMSCs, hubo una aparente mayor cicatrización ósea, al compararlo con el defecto óseo control, pero la diferencia entre el control y el experimental no fue significativa

Al conejo número 3, se le implantó también hMSCs provenientes del paciente N° 1, pero que fueron cultivadas en medio osteogénico durante 9 días antes de su implantación con microesferas de atelocolágeno y PRP de conejo. En estos especímenes, se observó un resultado macroscópico similar al obtenido con el conejo número 2. El defecto donde se había implantado

las hMSCs se notó una aparente mayor cicatrización ósea, en comparación con el defecto control, sin embargo, la diferencia entre ellos tampoco fue evidente.

A pesar de que las diferencias observadas en la cicatrización de los defectos controles y experimentales, en los conejos 2 y 3, no fueron concluyentes, el análisis macroscópico de estos conejos sugiere que la presencia de hMSCs, bajo las condiciones evaluadas, podría estar contribuyendo con el proceso de cicatrización ósea. En contraste, la implantación de hMSCs con microesferas de colágeno y PRP de conejo en los conejos 1 y 4, aparentemente, no lograron producir suficiente tejido óseo como para regenerar el defecto. Esto sugiere que la presencia de las hMSCs, de alguna manera y bajo las condiciones utilizadas en estos conejos (1 y 4), no logró mejorar el proceso de cicatrización ósea.

Por otra parte, hay que resaltar que, el examen macroscópico de los especímenes con los defectos óseos controles de los conejos 1, 2, 3 y 4, donde se implantaron solamente microesferas de colágeno incluidas en PRP de conejo, mostró que la presencia de estos elementos en el implante pareciera favorecer de alguna manera, el proceso de cicatrización en defectos óseos de tamaño crítico, los cuales no cicatrizan de manera espontánea.

Debido a que, a través de evaluaciones radiográficas de los conejos 1, 2, 3 y 4, ya teníamos resultados parciales que sugerían que no había diferencias importantes entre la cicatrización del lado experimental y el control, estimamos que podían existir varios factores para explicar este resultado aparente: el poco tiempo de inducción osteogénica, el uso de plaquetas de conejos produciendo citoquinas y factores de crecimiento de conejo que pudieran no actuar sobre las células mesenquimales humanas. También, pensamos que podría ser beneficioso la presencia de células progenitoras endoteliales en los implantes, para inducir, adicionalmente, angiogénesis. Por estas razones, se decidió cambiar las condiciones de trasplante e implantación de las hMSCs, en dos conejos adicionales. Así, a los conejos 5 y 6 se les implantó hMSCs del paciente número 3, que fueron cultivadas, en una primera fase, una parte de las células en medio osteogénico y otra parte en medio de crecimiento endotelial (HMEC), durante 5 días. Posteriormente, las células provenientes de cada uno de estos cultivos fueron sembradas juntas, en una mezcla de medio osteogénico (3 volúmenes) y medio HMEC (1 volumen), 13 días previos a su implantación con microesferas de colágeno y PRP humano.

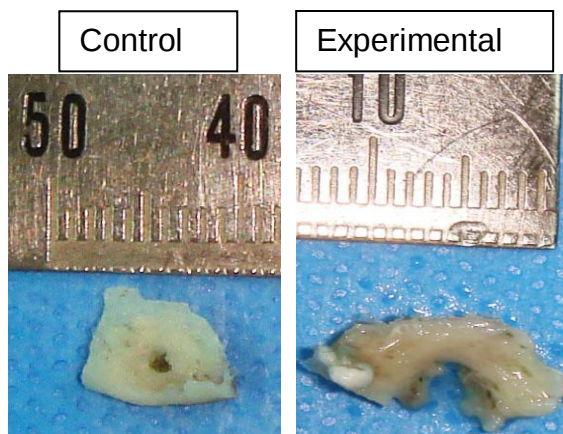
La evaluación macroscópica de los especímenes obtenidos de los conejos 5 y 6, posterior a 4 semanas de la implantación, mostró que los defectos óseos donde se implantaron las hMSCs presentaron una aparente mayor cicatrización al compararlos con sus respectivos controles. En este

caso, donde se evaluó la cicatrización solo a 4 semanas post-implantación, los defectos óseos controles (donde no se implantaron hMSCs) todavía no habían cicatrizado.

Los resultados inherentes a la observación macroscópica se muestran en la Figura 14 y 15.



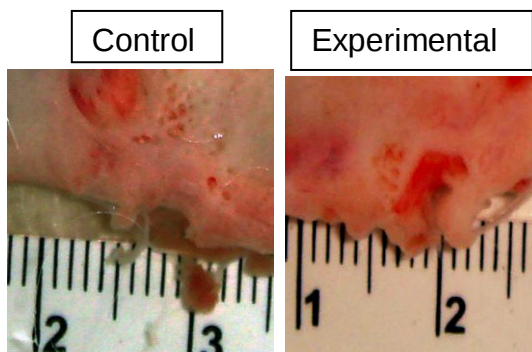
Especimen de hemi-mandibula completa, mostrando uno de los defectos óseos de tamaño crítico (en el círculo) obtenido a las 8 semanas



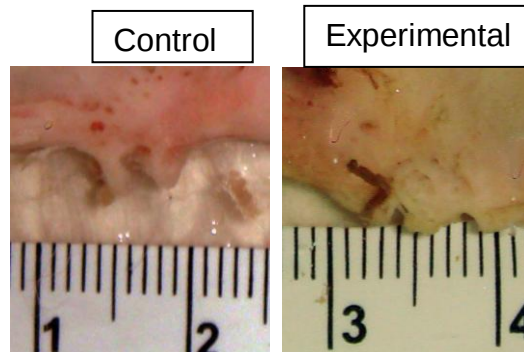
Conejo 1



Conejo 2



Conejo 3



Conejo 4

Figura 14. Evaluación macroscópica de los especímenes obtenidos a las 8 semanas post- implantación. Se muestran los especímenes de los conejos 1 y 2 después de que fueron descalcificados para el análisis histológico. Las muestras correspondientes a los conejos 3 y 4 corresponden a la fase previa al proceso de descalcificación.

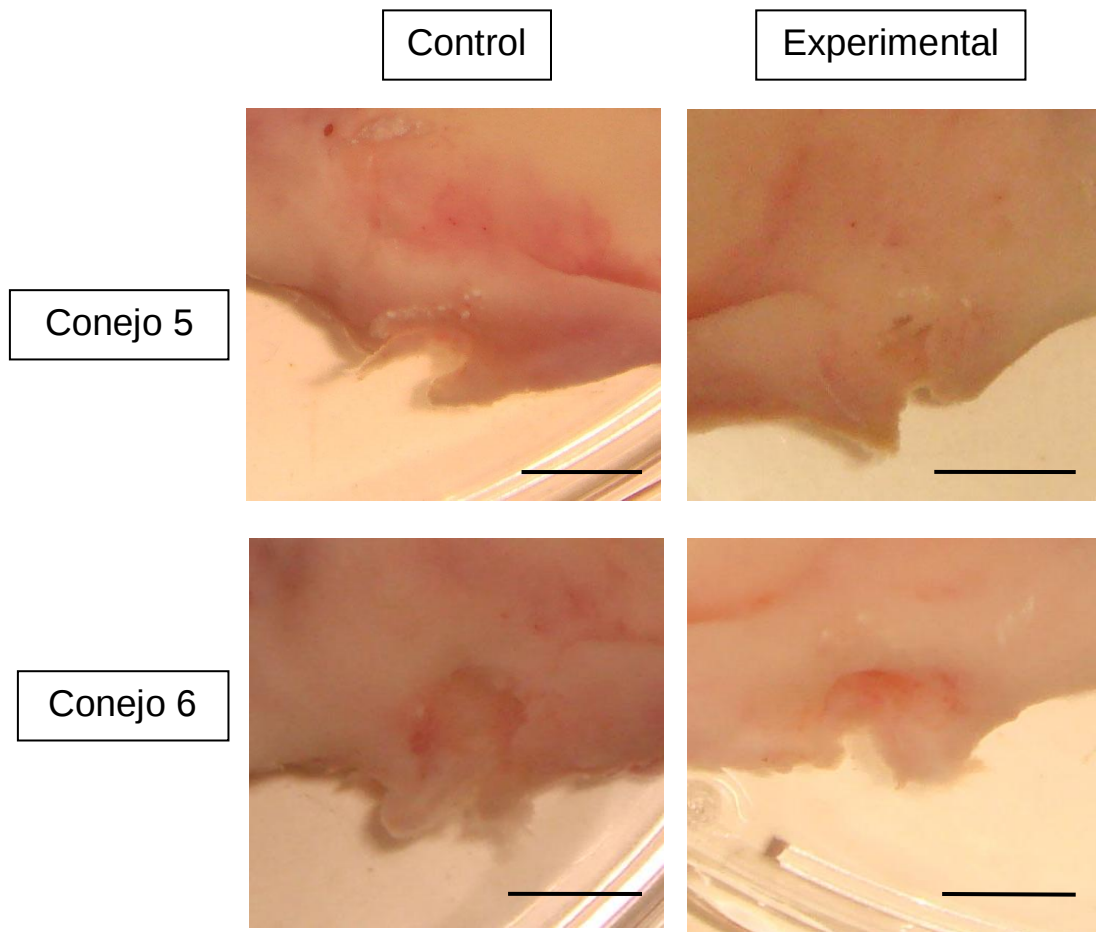


Figura 15. Evaluación macroscópica de los especímenes obtenidos, de los conejos 5 y 6, a las 4 semanas post- implantación. Se muestra los defectos control y los sitios donde se realizaron los implantes (experimental). La barra corresponde a 5 mm.

Observación radiográfica:

Una primera fase de la evaluación radiográfica de los conejos 1, 2, 3 y 4, se realizó mediante la toma de radiografías latero-mandibulares con placas oclusales, bajo anestesia intramuscular, a la cuarta semana post-quirúrgica. Esta evaluación no fue concluyente, ya que no se logró visualizar, radiográficamente, diferencias significativas.

La siguiente evaluación radiográfica se realizó, a los especímenes obtenidos de los conejos 1, 2, 3 y 4, se realizó a las 8 semanas post-implantación. Tal como se describió en el análisis macroscópico, a los animales 1 y 2 se les implantó células del paciente número 1, diferenciadas en medio osteogénico durante 48 horas, combinadas con las microesferas de colágeno y PRP de conejo. Se utilizó un control contra-lateral al que se le mantuvo las mismas condiciones de implantación, pero sin las hMSCs. Bajo estas condiciones, en el conejo 1, se observó que el defecto donde se había implantado las hMSCs permanecía parcialmente radiolúcido, evidenciando poca regeneración en esa zona. En el defecto óseo control se notó, una zona radiopaca con una densidad cercana a la del hueso sano circundante, sugiriendo una aparente, mayor regeneración del tejido óseo, en comparación con el defecto donde se implantaron las hMSCs.

Bajo las condiciones mencionadas para el conejo número 2, se notó que en el defecto donde se había implantado las hMSCs, una zona radiopaca con una densidad similar a la del hueso circundante al defecto realizado 8 semanas previas. El defecto óseo control permanecía parcialmente radiolúcido, con un área circundante radiopaca similar a la radiopacidad del hueso sano. Las diferencias radiográficas entre estos defectos, experimental y control, no fueron muy significativas.

Al conejo número 3, también se le implantó hMSCs provenientes del paciente N° 1, pero estas fueron cultivadas en medio osteogénico durante 9 días, antes de la implantación con microesferas de colágeno y PRP de conejo, en los defectos óseos generados. En los especímenes mandibulares obtenidos de este conejo número 3, después de 8 semanas de la implantación, se obtuvo un resultado radiográfico similar al del conejo 1. El defecto en el que se había implantado las hMSCs, mostró una imagen radiolúcida rodeada de una imagen radiopaca compatible con formación ósea alrededor del defecto. Sin embargo, en el defecto óseo control se observó una mayor zona radiopaca en el defecto óseo realizado, similar a la radiopacidad del tejido óseo circundante.

En relación al conejo número 4, al que se le implantó hMSCs provenientes del paciente N° 2, cultivadas en medio osteogénico durante 48 horas antes de la implantación con microesferas de colágeno y PRP de

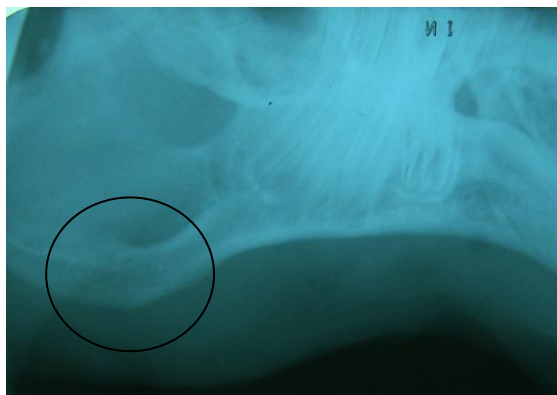
conejo; se observó poca diferencia radiográfica entre los defectos óseos experimental y control. Tanto en el defecto donde se habían implantado las hMSCs, como en el control, se notó una pequeña zona radiolúcida, compatible con el defecto realizado, rodeada de un área radiopaca compatible tejido óseo neoformado, de radiopacidad similar a la del hueso sano circundante.

De nuevo, estos resultados radiográficos nos sugieren que no hubo diferencias obvias entre la cicatrización de los defectos experimentales y controles realizados en los conejos 1, 2, 3 y 4. Sin embargo, a pesar de haber realizado defectos óseos de tamaño crítico en conejo, se observó un proceso de cicatrización ósea, aparentemente, favorable también en los defectos controles, donde se implantaron, solamente, microesferas de colágeno incluidas en PRP de conejo.

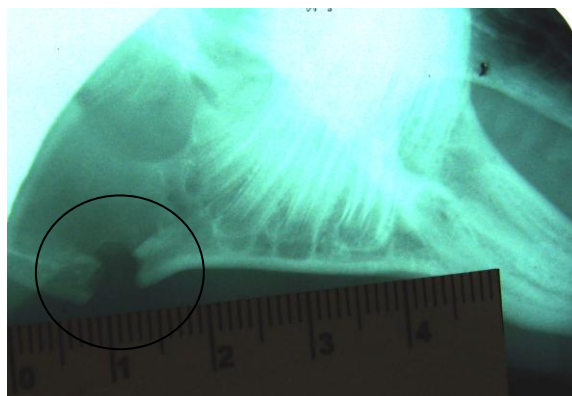
Tal como se describió anteriormente, a los conejos 5 y 6, se les implantó hMSCs del paciente número 3, que fueron cultivadas, en una primera fase, una parte de las células en medio osteogénico y otra parte en medio de crecimiento endotelial (HMEC), durante 5 días. Posteriormente, las células provenientes de cada uno de estos cultivos fueron sembradas juntas, en una mezcla de medio osteogénico (3 volúmenes) y medio HMEC (1 volumen), 13 días previos a su implantación con microesferas de colágeno incluidas en PRP humano. Con este procedimiento, se intentó diferenciar las

hMSCs, tanto hacia células productoras de matriz ósea, como hacia células promotoras de la angiogénesis. La evaluación radiográfica de los especímenes obtenidos en estos conejos, a las 4 semanas post-implantación, mostró que los defectos óseos donde se implantaron las hMSCs presentaron una mejoría radiográfica importante al compararlos con sus controles. En este sentido, se observó que en los defectos donde se implantaron las hMSCs redujeron significativamente la imagen radiolúcida generada por el defecto óseo realizado. Además, se notó formación de tejido radiopaco parecido a la radiopacidad del tejido óseo circundante. En los defectos óseos controles (donde no se implantaron hMSCs) no se observó neo-formación de tejido óseo. A pesar, de que los defectos no habían regenerado por completo, se evidenció una mejoría radiográfica importante en los defectos experimentales, en comparación con sus defectos controles.

Los resultados de la evaluación radiográfica se muestran en la Figura 16, 17 y 18.



Pre-quirúrgica



Lesión de tamaño crítico

Figura 16. Observación radiográfica inicial de la porción anterior del ángulo mandibular. Los círculos indican la zona donde se realizó el defecto óseo de tamaño crítico.

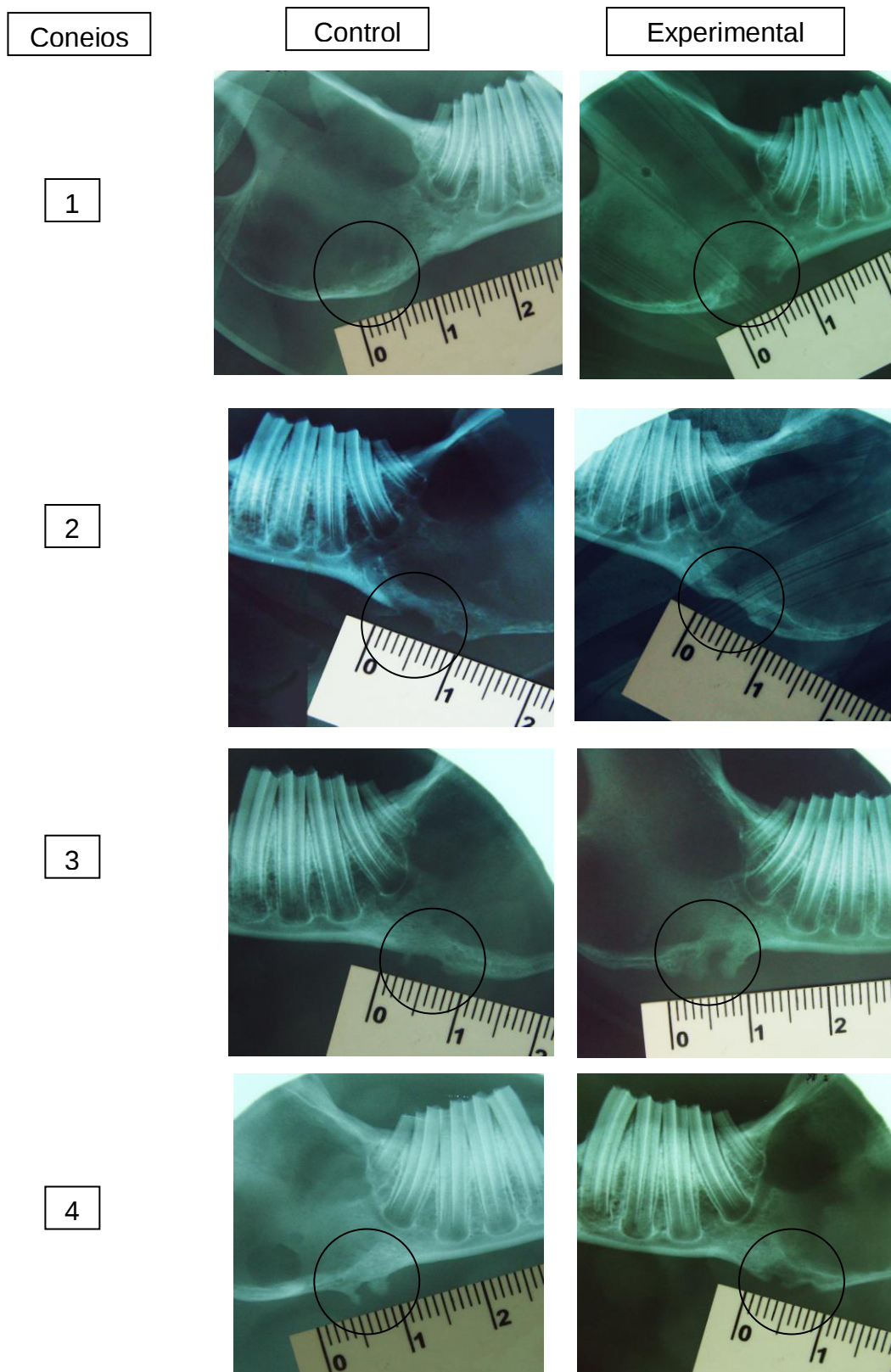


Figura 17. Observación radiográfica de la porción anterior del ángulo mandibular a las 8 semanas post-implante. Los círculos indican la zona donde se realizó el defecto óseo de tamaño crítico.

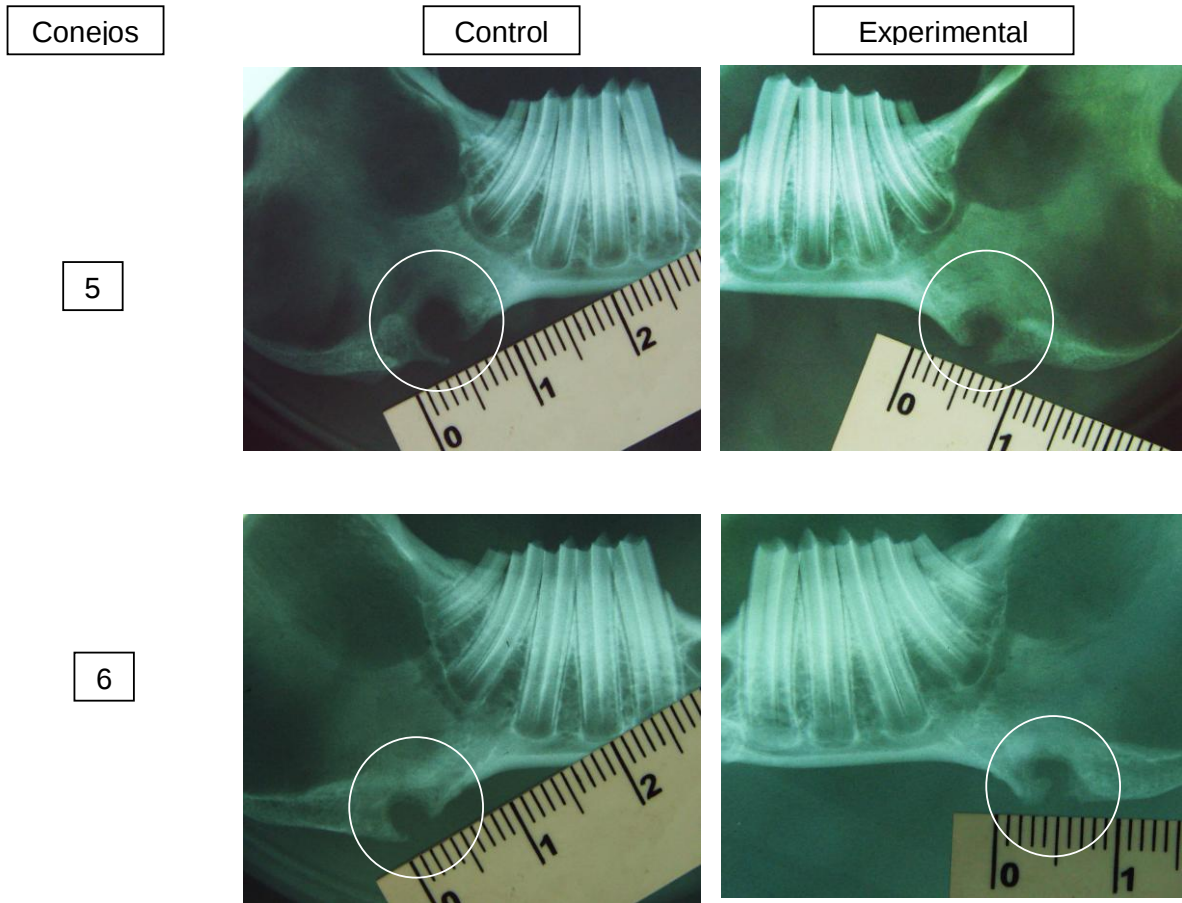


Figura 18. Observación radiográfica de la porción anterior del ángulo mandibular a las 4 semanas post-implante. Los círculos indican la zona donde se realizó el defecto óseo de tamaño crítico.

Análisis histológico

Tal como se describió en la evaluación macroscópica y radiográfica, la evaluación histológica de los especímenes obtenidos de los conejos 1, 2, 3 y 4 se realizó a las 8 semanas post-implantación, mediante coloración de hematoxilina-eosina (Meyer) y coloración de azul de toluidina. En la tabla I se muestra un resumen del análisis histológico, donde se compara el defecto experimental con su control de cada conejo y sus condiciones de implantación.

La evaluación histológica de la muestra tomada del defecto óseo control del conejo número 1, al que se le implantó microesferas de colágeno con plasma rico en plaquetas de conejo, mostró neoformación ósea moderada con presencia de osteocitos y restos del material implantado en proceso de degradación, además de gran cantidad de fibras colágenas junto a numerosos fibroblastos. Por su parte, el defecto óseo al que se le implantó las hMSCs del paciente 1, presentó neoformación ósea con presencia de osteoblastos activos, produciendo material osteoide, se observó también la presencia de algunos osteocitos en el tejido óseo inmaduro. Este defecto experimental, no mostró, histológicamente, fibras colágenas. Este resultado sugiere que, el proceso de cicatrización ósea se presentó de mejor calidad en el defecto en el que se implantaron las hMSCs, al compararlo con su control. A pesar, de que radiográfica y macroscópicamente se observó lo

contrario, el defecto control del conejo 1 mostró histológicamente, menos neoformación ósea, con áreas de fibrosis, que el defecto experimental.

La evaluación histológica de las muestras obtenidas del conejo número 2, permitió observar en el defecto donde se implantaron las hMSCs del paciente 1, en las condiciones ya descritas, formación de tejido osteoide con osteoblastos activos y gran cantidad de osteocitos, también se observó cierta cantidad de fibras colágenas cercanas a la zona del defecto. En el defecto control de este conejo número 2, se evidenció presencia de osteocitos en un tejido inmaduro desorganizado, y a diferencia del defecto experimental, no se observaron áreas con fibras colágenas ni células fibroblásticas. Sin embargo, los hallazgos encontrados no parecen determinar una diferencia importante en el proceso de cicatrización ósea entre los defectos en condiciones control y experimental. Nuevamente, se evidencia la capacidad de cicatrización ósea en el defecto control de tamaño crítico, en el que solo se implantó microesferas de colágeno con plasma rico en plaqueta de conejo.

El análisis histológico de las muestras obtenidas del conejo número 3, también se realizó después de 8 semanas de la implantación de hMSCs, del paciente 1, en los defectos óseos creado de tamaño crítico. En el defecto donde se implantaron las hMSCs, se observó tejido óseo neoformado que consistió, principalmente en tejido osteoide y gran cantidad de osteocitos,

también se observaron osteoblastos cercanos al hueso inmaduro. Por otra parte, en el defecto control contralateral, también se observó tejido osteoide con osteocitos y presencia de osteoblastos activos, pero a diferencia del defecto experimental, se observó presencia de pocas fibras colágenas. Sin embargo, al igual que en el conejo número 2, no hubo diferencias importantes, en cuanto a la cicatrización ósea de los defectos, de tamaño crítico, control y experimental.

La evaluación histológica de las muestras obtenidas del conejo número 4, a través de las tinciones mencionadas, permitió observar la presencia de osteoblastos activos junto al tejido osteoide con cierta cantidad de osteocitos, tanto en el defecto donde se implantaron las hMSCs (del paciente número 2) como en el defecto control contralateral. Pero a diferencia del defecto experimental, el defecto control presentó un leve infiltrado inflamatorio crónico y pocas fibras colágenas. No hubo diferencias importantes entre los dos defectos óseos de tamaño crítico creados. Lo que nuevamente sugiere, la capacidad de generar una cicatrización ósea aceptable, con solo implantar microesferas de colágeno y PRP de conejo, autólogo en este caso.

Las muestras obtenidas de los conejos 5 y 6, posterior a las 4 semanas de la implantación de las hMSCs del paciente 3, también fueron analizadas histológicamente, teñidas con hematoxilina-eosina y azul de

toluidina. En los defectos en los que se implantaron las hMSCs, se observó la presencia de osteoblastos activos junto al tejido osteoide neoformado con abundantes osteocitos, también se observaron algunos osteoclastos cercanos y restos del material implantado. Por su parte, en los defectos control, se observó gran cantidad de fibras colágenas y células fibroblásticas junto a los restos del material implantado. Tanto en los defectos experimentales, como en los controles se evidenció un infiltrado inflamatorio crónico. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones de implantación de estos conejos, en las que fue variado el período de cultivo en medios de diferenciación y el PRP en el que se incluyeron las hMSCs fue de humano; los defectos experimentales, a pesar de que no habían cicatrizado por completo, mostraron una mejor cicatrización, en comparación con sus defectos controles, en los que aún había restos del material implantado y abundantes fibras colágenas.

En todos los especímenes, se observó la presencia de médula ósea grasa y vascular. Los resultados de la evaluación histológica se muestran en las Figura 19, 20 y 21.

Tabla I. Análisis histológico de las muestras tomadas a partir de las zonas implantadas en los especímenes mandibulares de los 6 conejos. Los espacios en blanco significan ausencia.

Parámetros evaluados	Conejos											
	Analizados 8 semanas post-implante								Analizados 4 semanas post-implante			
	Implante incluido en PRP de conejo								Implante incluido en PRP de humano			
	48 horas en Medio osteogénico (Paciente 1)				9 días en Medio osteogénico (Paciente 1)		48 horas en Medio osteogénico (Paciente 2)		15 días de co-cultivo en Medio osteogénico y Medio endotelial (Paciente 3)			
	1		2		3		4		5		6	
	Control	Exp.	Control	Exp.	Control	Exp.	Control	Exp.	Control	Exp.	Control	Exp.
Infiltrado inflamatorio							Crónico		Crónico	Crónico	Crónico	Crónico
Reacción a cuerpo extraño												
Material implantado	Presente	Presente					Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Asos neoformados					Presente					Presente		Presente
Tejido de granulación												
Osteocitos	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente		Presente		Presente
Osteoblastos		Presente		Presente	Presente	Presente	Presente	Presente		Presente		Presente
Osteoclastos										Presente		Presente
Tejido óseo maduro												
Tejido osteoide	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente		Presente		Presente
Fibras de colágeno	Presente			Presente	Presente		Presente		Presente		Presente	
Fibroblastos	Presente								Presente		Presente	
Médula ósea	Vascular y Grasa	Vascular y Grasa	Vascular y Grasa	Vascular y Grasa	Vascular y Grasa	Vascular y Grasa	Vascular y Grasa	Vascular y Grasa	Vascular y Grasa	Vascular y Grasa	Vascular y Grasa	Vascular y Grasa

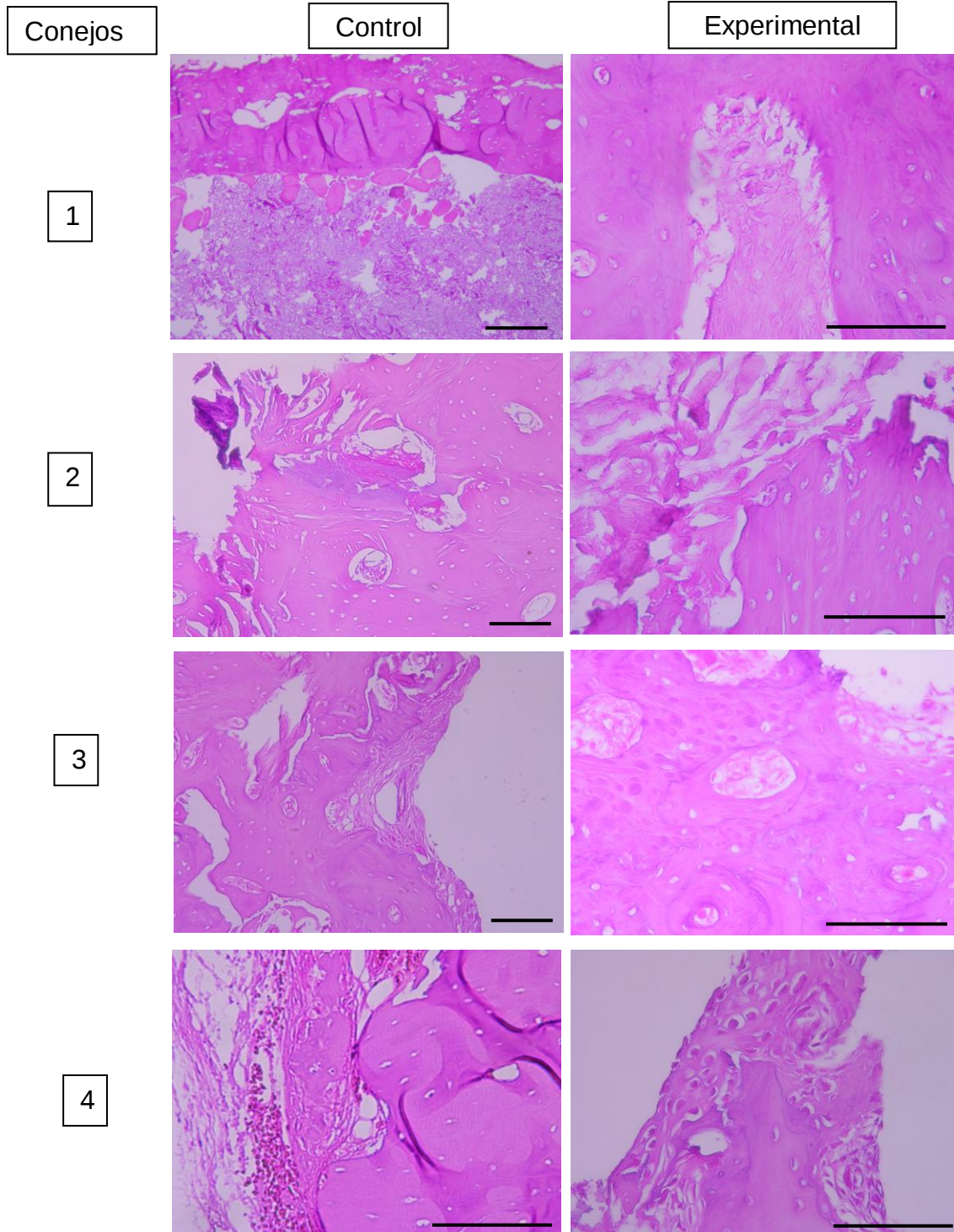


Figura 19. Análisis histológico de los cortes obtenidos a partir de los especímenes mandibulares después de 8 semanas de la implantación, teñidos con Hematoxilina-Eosina. Las barras corresponden a 100 μm .

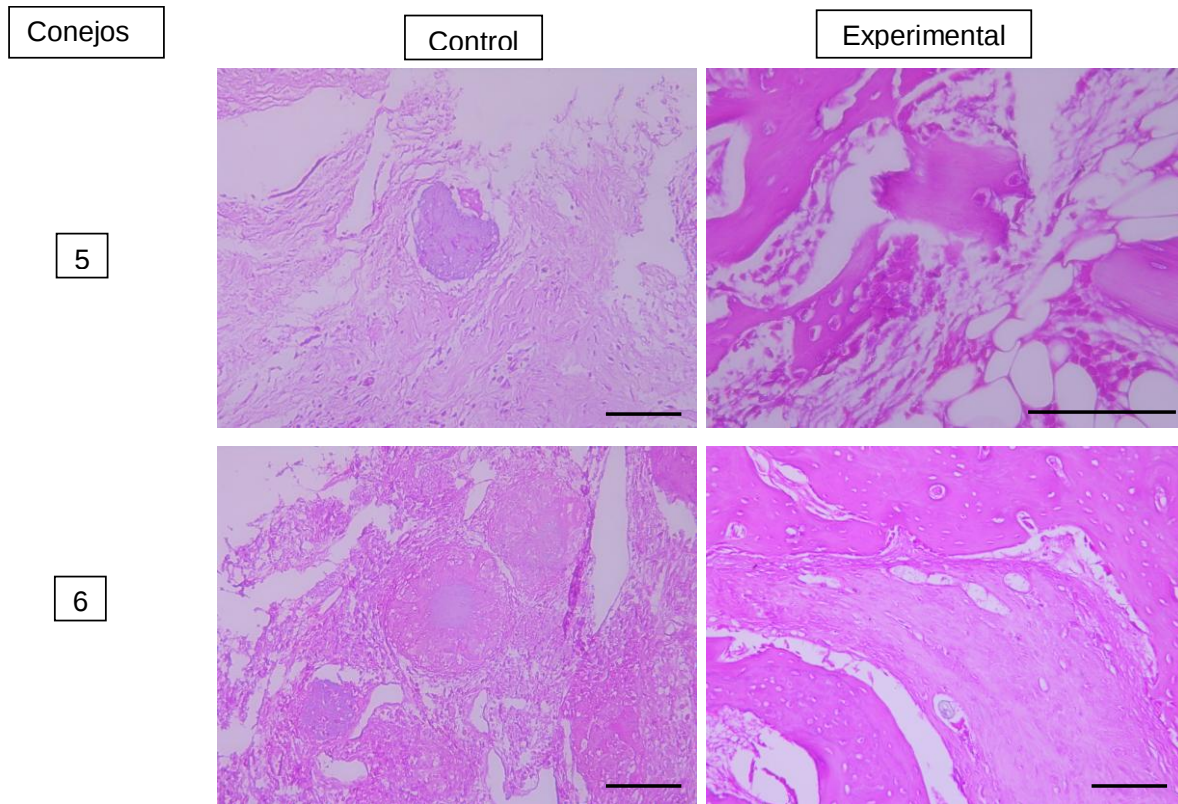


Figura 20. Análisis histológico de los cortes obtenidos a partir de los especímenes mandibulares después de 4 semanas de la implantación, teñidos con Hematoxilina-Eosina. Las barras corresponden a 100 μ m.

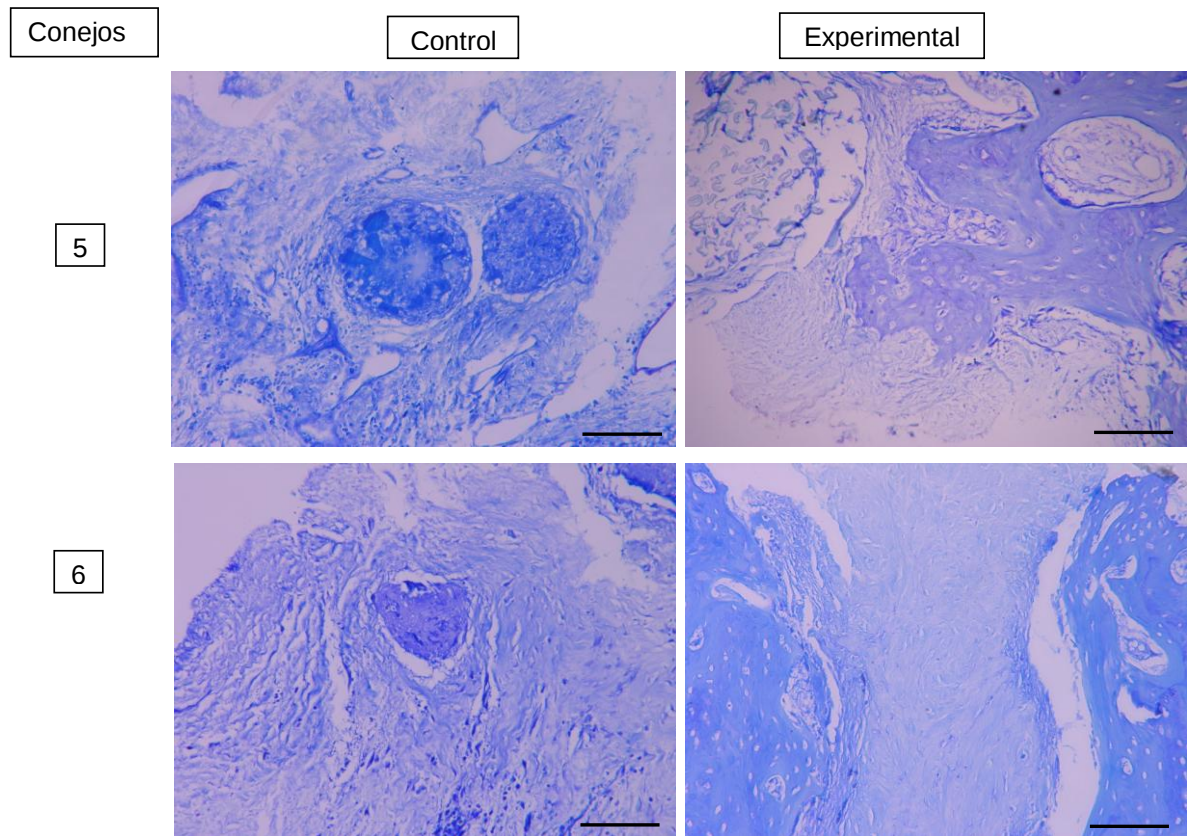


Figura 21. Análisis histológico de los cortes obtenidos a partir de los especímenes mandibulares después de 4 semanas de la implantación, teñidos con azul de Toluidina. Las barras corresponden a 100 μ m.

DISCUSIÓN

El reparar defectos óseos en el esqueleto cráneo facial, constituye el mayor reto de la cirugía maxilofacial, debido a que las técnicas tradicionales de colocación de injertos requieren un tiempo sustancial y gran esfuerzo, con el riesgo de morbilidad asociada. El tema de la regeneración ósea se encuentra al frente de las aplicaciones actuales de la ingeniería de tejidos, a través del uso de MSCs ⁽³⁹⁾. Las MSCs presentes en el estroma de la médula ósea, se pueden diferenciar hacia diferentes tipos de tejidos de origen mesodérmico, incluyendo hueso y cartílago. Gracias a dicha característica, ha sido comprobado que las MSCs constituyen la mayor fuente de células para la ingeniería de tejidos. Un sustituto de hueso ideal, generado a través de la ingeniería de tejidos, debe poseer tres elementos esenciales: células osteoprogenitoras, factores osteoinductores y un soporte o andamiaje osteoconductor ⁽⁷¹⁾.

Hasta la fecha, se ha demostrado, tanto in vitro como in vivo, el potencial osteogénico de las MSCs ^(72, 73). Además, en la implantación de MSCs en defectos óseos de tamaño crítico, se han utilizado diferentes soportes osteoconductores, tales como la cerámica porosa de hidroxiapatita y el fosfato tricálcico, conjuntamente con medios enriquecidos con factores osteoinductores ⁽⁷⁴⁾. Así, se han logrado reparaciones óseas exitosas, en defectos de este tipo, en perros, ovejas, cabras, ratas y ratones ^(35, 36, 72, 75, 76).

En general, estas aplicaciones experimentales, desarrolladas en animales, han utilizado MSCs provenientes del mismo animal (autólogas) o de animales singénicos (distintos individuos pero de igual composición genética).

En este estudio nos propusimos evaluar, en un modelo animal, la capacidad de **células madre mesenquimales humanas** (hMSCs), provenientes de médula ósea, de regenerar tejido óseo, en conjunto con microesferas de atelocolágeno (como soporte osteoconductor) y plasma rico en plaquetas, tanto alogénico como xenogénico, en relación a las hMSC (como fuente de factores osteoinductores). Este modelo, en conejos, se desarrolló con la intención de evaluar, específicamente, el potencial osteogénico de MSCs humanas, previo a su posible aplicación en seres humanos.

Para ello, se escogió una estrategia experimental desarrollada en dos fases. La primera, consistió en evaluar, en el laboratorio la potencialidad de las hMSCs de ser cultivadas y expandidas in vitro, así como también, su capacidad de diferenciación in vitro hacia células osteogénicas, productoras de matriz ósea mineralizada, y hacia células endoteliales promotoras de angiogénesis.

Aislamiento, cultivo y expansión de células madre mesenquimales humanas (hMSCs)

Durante el cultivo de las hMSCs en medios de diferenciación, se utilizó un esquema triple:

1. Parte de las hMSCs expandidas, fueron cultivadas en medio osteogénico durante 48 horas, para inducir su diferenciación hacia células osteoblásticas, antes de ser implantadas en el modelo in vivo.
2. Otra parte de las hMSCs expandidas, se cultivaron en medio osteogénico durante 9 días, antes de ser implantadas en el modelo animal.
3. Otras dos porciones de las hMSCs expandidas, se cultivaron por separado, una en medio osteogénico y otra en medio de cultivo para crecimiento de células endoteliales (HMEC) durante 5 días. Luego, estas células se re-cultivaron juntas, durante 13 días, antes de ser implantadas en el modelo in vivo. Este tercer esquema fue diseñado pensando en la posibilidad de que, durante el proceso de regeneración ósea a partir de MSCs, no solamente se necesite la presencia de células osteoblásticas, sino también células promotoras de la formación nuevos vasos sanguíneos, que permitan nutrir al hueso neoformado. La segunda fase consistió en implantar las hMSCs, previamente cultivadas, expandidas y diferenciadas, en defectos óseos de tamaño crítico, generados en un modelo desarrollado en conejos.

Durante el cultivo de las células madre mesenquimales (MSCs), de las muestras de médula ósea, se seleccionaron solo aquellas células que mostraron la capacidad de adherirse al plástico de las placas de cultivo, ya que las células madre hematopoyéticas y otras células presentes en las muestras de médula ósea (todo el linaje de la serie eritroide, leucocitaria, linfocitaria, trombopoyética, monocitos-macrófagos, NK, dendríticas, etc), en su mayoría no poseen dicha capacidad, o no tienen capacidad de sobrevivencia por largo tiempo como las células madre. De esta forma, se seleccionaron las MSCs humanas a expandir.

Estas células adherentes, así seleccionadas, fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia de 70-80% (o sub-confluencia) (Fig. 9), ya que si llegan a confluir, formando una monocapa completa, las MSCs pierden viabilidad y capacidad de expansión y diferenciación. Por lo tanto, se fue cuidadoso en realizar los pasajes necesarios al alcanzar la confluencia mencionada, para así obtener células con la mayor capacidad de expansión y diferenciación posible.

Expresión de marcadores de superficie en las hMSCs

El siguiente paso fue la caracterización de las células cultivadas y expandidas. Para ello, se analizó la expresión de marcadores de MSCs, mediante citometría de flujo. Se determinó que las células provenientes de

medula ósea humana de los tres pacientes utilizados en este estudio, expresaron los marcadores, CD90 +, CD73 +, CD166 +, CD29 +, CD49e + y no expresaron marcadores hematopoyéticos, es decir, CD45 -, CD34 -, CD14 - y CD11 -; lo que las identificó como MSCs ⁽²¹⁻²⁶⁾. Así logramos aislar, cultivar y expandir MSCs humanas, provenientes de médula ósea.

Inducción de diferenciación de las hMSCs a células precursoras de tejido óseo y endotelial

Una vez que se logró caracterizar y expandir al número de células adecuado, reportado ⁽³⁾, para ser implantado en defectos óseos de tamaño crítico en conejos, procedimos a inducir la diferenciación de las hMSCs en medio de cultivo osteogénico a diferentes períodos de cultivo. Se cultivaron las células de un mismo paciente en medio de diferenciación osteogénica por 48 horas previo a la implantación, y por 9 días previos a la implantación. Evaluamos diferentes condiciones y esquemas de implantación, para determinar cuál resultaría el mejor, al momento de la implantación. Por esta razón, en el esquema de implantación utilizado en los conejos 5 y 6, se adicionaron otros factores, ya mencionados (ver materiales y métodos). Para ello se procedió a inducir, también, la diferenciación de las hMSCs en medio de cultivo para crecimiento de células endoteliales (HMEC).

Durante el proceso de regeneración ósea, es necesaria la neoformación de vasos sanguíneos, a través de células precursoras de origen endotelial, al mismo tiempo en el que se produce la neoformación ósea, y de esta manera permitir la nutrición del hueso en formación. Por esta razón, se quiso evaluar también (ver esquema de implantación de los conejos 5 y 6), la capacidad de promover una cicatrización ósea óptima, de un co-cultivo de células inducidas a diferenciarse hacia precursores endoteliales y hacia precursores osteoblásticos. Para ello, una parte de las hMSCs expandidas, fueron recultivadas en medio osteogénico y otra porción en medio para crecimiento de células endoteliales, por separado. Luego se realizó el co-cultivo de estas hMSCs, en proceso de diferenciación, en 3 volúmenes de medio osteogénico y 1 volumen de medio para crecimiento de células endoteliales, antes de ser implantadas en el modelo animal.

Microesferas de atelocolágeno como soporte osteoconductor

Se evaluó la capacidad de la hMSCs, cultivadas y expandidas, de adherirse a un soporte. Este consistió en microesferas de atelocolágeno, ya utilizadas en trabajos previos del laboratorio de Patología Celular y molecular (LPCM) del IVIC, con MSCs provenientes de pulpa dental y de líquido amniótico; en trabajos de Hasegawa y col. ⁽⁶⁰⁾ y de George y col. ⁽⁶¹⁾, con buenos resultados. Las hMSCs mostraron la capacidad de adherirse alrededor de toda la superficie tridimensional de las microesferas de

atelocolágeno. Al mismo tiempo, cambiaron su morfología a células menos alargadas y más poligonales (ver Figura 12). Las células adheridas mostraron la capacidad de generar matriz extracelular y permitir depósitos de calcio, tal como lo muestra la tinción con alizarina (Figura 13).

Implante de las hMSCs

Las células así cultivadas fueron implantadas en los defectos óseos de tamaño crítico realizados en ambos ángulos mandibulares de cada conejo estudiado ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾.

En trabajos previos ⁽⁷⁷⁾, el defecto óseo en mandíbulas de conejos, se generó mediante la extracción del incisivo central inferior izquierdo, donde posteriormente se inyectaron MSCs autólogas combinadas con PLGA, como soporte. Luego el orificio del alvéolo fue suturado ⁽⁷⁷⁾. La desventaja de realizar la extracción del incisivo central inferior del conejo, es que posiblemente el alveolo quede parcialmente expuesto a la cavidad bucal, lo que podría alterar el proceso de cicatrización ósea (por infección del área), ya que no se produce un buen cierre primario del alvéolo al suturarlo. Además podría también impedir la alimentación correcta del conejo en el período postoperatorio. Por su parte, en el estudio de Jianqui y col. ⁽⁶⁹⁾, realizaron defectos óseos mandibulares de tamaño crítico en conejos, en la porción anterior del ángulo mandibular, para evaluar diferentes materiales de

regeneración ósea guiada, y determinaron que esta es un área de fácil acceso quirúrgico y evaluación radiográfica. Por esta razón, decidimos realizar los defectos óseos en el ángulo mandibular.

El tamaño crítico de defectos óseos en conejos es de 5 mm. Este constituye el diámetro que ha sido reportado como el tamaño en el que no se produce una cicatrización espontánea durante la vida del animal ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾. Así, se realizó un defecto de 5 mm en la porción anterior de uno de los ángulos mandibulares de cada conejo y se le implantó las hMSCs cultivadas, provenientes de médula ósea de cada paciente, según el esquema de implantación (ver materiales y métodos), junto con microesferas de atelocolágeno incluidas en medio osteogénico (conejos 1, 2, 3 y 4) y medio endotelial (conejos 5 y 6) y plasma rico en plaquetas de conejo o humano, respectivamente. Mientras que a los defectos controles, se les implantaron los mismos componentes, con excepción de las hMSCs. En un grupo de conejos se utilizó PRP de conejo (Conejos 1, 2, 3 y 4) y en otro grupo, PRP humano (conejos 5 y 6), debido a que, al obtener resultados parciales aparentes en la evaluación radiográfica y macroscópica, que indicaban pocas diferencias entre la cicatrización ósea de los defectos experimentales y controles, pensamos que el uso de plaquetas de conejos podrían estar produciendo citoquinas y factores de crecimiento de conejo, que pudieran no actuar sobre las células mesenquimales humanas. Por ello, se decidió utilizar

(en los conejos 5 y 6) PRP humano, que proveerá los factores de crecimiento humano, a las MSCs humanas.

Se pensó en la posibilidad de que pudiera haber rechazo del huésped contra el injerto, debido al origen humano de las células implantadas en los conejos. Si bien, las hMSCs expresan poco o nada de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), y por este motivo no se debería generar ni alo ni xeno-rechazo, optamos por prevenir cualquier posible rechazo con la administración de ciclosporina a los conejos, desde el primer día del injerto y hasta su sacrificio. No encontramos datos específicos en la literatura acerca de la dosis necesaria para inmunosuprimir a conejos, por ello decidimos utilizar el equivalente a la dosis en humanos (50 mg/día intraperitoneal). Se escapa a los objetivos de este estudio, investigar si la dosis fue adecuada o no para prevenir el xeno-rechazo, sin embargo, por la ausencia de infiltrado inflamatorio importante, es factible que no se haya producido una reacción de rechazo significativa contra el injerto por parte del huésped.

Los resultados histológicos del primer grupo de conejos (conejos 1, 2, 3 y 4) sugirieron que las diferencias entre la cicatrización ósea de los defectos experimentales y controles, no fue significativa, a pesar de algunas excepciones, en la que se observó gran cantidad de fibras colágenas junto al tejido osteoide neoformado (defecto control del conejo 1). Lo que indica que a pesar de haber realizado defectos óseos de tamaño crítico, los cuales no

cicatrizan espontáneamente, se observó moderada formación ósea con células osteoblásticas. Por lo tanto, el uso de microesferas de atelocolágeno y PRP de conejo, solamente, generó cierto grado de regeneración ósea en defectos de tamaño crítico. Además, la implantación de hMSCs, en los defectos experimentales de este grupo de conejos, no produjeron, de una manera evidente y marcada, los resultados esperados.

Por esta razón se decidió cambiar las condiciones de implantación del segundo grupo de conejos (conejos 5 y 6). Al utilizar mayor tiempo de cultivo en medios de diferenciación, adición de medio para células endoteliales y uso de PRP humano, radiográfica e histológicamente, se evidenció mayor neoformación de tejido osteoide con osteoblastos activos, al compararlo con sus controles, en los que se observó gran cantidad de fibras colágenas junto a los restos del material implantado. Por lo tanto, la utilización de un co-cultivo de hMSCs diferenciadas en medio osteogénico y en medio para células endoteliales incluidas en PRP humano, pareciera tener una mayor efectividad, para regenerar defectos óseos de tamaño crítico.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio, permiten concluir:

- Las MSCs humanas, provenientes de médula ósea, poseen el potencial de expansión y diferenciación in vitro, hacia células precursoras osteoblásticas y hacia células precursoras endoteliales. La combinación de células precursoras óseas y células promotoras de angiogénesis, junto a un soporte de colágeno y medios enriquecidos (plasma rico en plaquetas); representan la clave para el desarrollo de un sistema tridimensional de regeneración ósea, basado en la ingeniería de tejidos.
- El colágeno, en su presentación de microesferas, mostró ser un soporte apropiado para incluir las células madre mesenquimales humanas, previo a su implantación, en defectos óseos de la región Buco-maxilofacial.
- Las MSCs humanas demostraron, in vitro, la capacidad de adherirse alrededor de toda la superficie tridimensional de las microesferas de atelocolágeno, utilizadas como soporte, permitiendo su utilización para implantarlas en defectos óseos.

- El implante constituido por células madre mesenquimales humanas expandidas y recultivadas en una primera fase, durante 5 días en medios de diferenciación osteogénica y en medios para células endoteliales, por separado; y en una segunda fase, el cocultivo de las células provenientes de ambos medios, durante 13 días más, junto con microesferas de colágeno, incluidas en plasma rico en plaquetas humano, pareciera ser efectiva para promover la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico.

- Al implantar, en defectos óseos de tamaño crítico en conejos, solamente microesferas de colágeno con plasma rico en plaquetas de conejo y humano, genera cierto grado de regeneración ósea.

PROYECCIONES

- Evaluar, en un mayor número de conejos, la efectividad del co-cultivo de MSCs diferenciadas en medios osteogénico y endotelial, en la regeneración ósea, histomorfométricamente y a través de inmunohistoquímica.

- Identificar el rol de las hMSCs diferenciadas en medio endotelial en el proceso de regeneración ósea, para determinar cual de las células precursoras (osteoblásticas o endoteliales o ambas) son las que contribuyen a mejorar el proceso de regeneración ósea.
- Identificar el origen de las células que promueven el crecimiento óseo. ¿Serán los osteoblastos humanos implantados los que generan la regeneración ósea ó ellos estimulan el desarrollo de osteoblastos del huésped?
- La efectividad mostrada por las hMSCs en reparar el tejido óseo en el modelo animal, abre la puerta para el estudio clínico controlado de la implantación de éstas en la regeneración ósea en humanos.

REFERENCIAS

- 1. Shanti R, Li W, Nest L, Wang X, Tuan R.** Adult Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties, Characteristics, and Applications in Maxillofacial Surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 2007, 65: 1640-47.
- 2. Ito K, Yamada Y, T Nagasaka, Baba S, Ueda M.** Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: A comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J Biomed Mater Res* 2005, 73A: 63-72.
- 3. Pieri F, Corinaldesi G, Aldini NN, Donati D.** Effect of Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on Healing of Standardized Bone Defects in Alveolar Ridge: A Comparative Histomorphometric Study in Minipigs. *J Oral Maxillofac Surg* 2009, 67:265-72.
- 4. Leeson T, Leeson R, editores.** Tejido conectivo especializado: cartílago y hueso. En: *Histología*. Primera edición. Editorial interamericana, S.A. México 1967: 98-118.
- 5. Guyton A, Hall J, editores.** Hormona paratiroidea, calcitonina, metabolismo del calcio y del fosfato, vitamina D, huesos y dientes. En: *Tratado de Fisiología Médica*. Novena edición. Interamericana, McGraw-Hill. México D.F. 1997: 1079-98.
- 6. Van De Graaff:** Support and Movement, Skeletal System: Introduction and the Axial Skeleton. En: *Human Anatomy*, Sixth Edition. McGraw-Hill Companies. USA, 2001: 131-70.
- 7. Mader S, editors.** Support, Movement, and Protection. The Skeletal System. En: *Understanding Human Anatomy & Physiology*. Fifth Edition. McGraw-Hill Companies. USA, 2004: 83-112.
- 8. Berne R, Levy M, editors.** Endocrine regulation of calcium and phosphate metabolism. En: *Physiology*. Fourth edition. Mosby. USA, 1998: 848-71.
- 9. Sanz JV, Martinez R, García JM, López JL.** Regeneración ósea. En: **Navarro C, García F, Ochandiano S, editores.** *Tratado de Cirugía Oral y Maxilofacial*. Tomo II. Arán Ediciones S.L. España, 2004: 549-58.
- 10. Parsons P, Butcher A, Hesselden K, Ellis K, Maughan J, Milner R, et al.** Platelet-rich concentrate supports human mesenchymal stem cell proliferation, bone morphogenetic protein-2 messenger RNA expression,

alkaline phosphatase activity, and bone formation in vitro: a mode of action to enhance bone repair. *J Orthop Trauma*. 2008 Oct; 22(9):595-604.

11. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 9-21.

12. Sapega CL, Gher ME, Quintero G, Lafferty TA. A comparison of polylactic acid granules and decalcified freeze-dried bone allograft in human periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1993 Feb; 64(2):103-9.

13. Salvado M, Martín AP, Collia F, Domínguez J, Blanco J, Pérez de la Cruz MA, Cardoso A, De Pedro JA. Study of bone regeneration by endomedullar implantation of biomaterials. *Patología del Aparato Locomotor* 2005; 3(1):24-30.

14. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi T, Hata K, Nagasaka T. Autogenous Injectable Bone for Regeneration with Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma: Tissue-Engineered Bone Regeneration. *Tissue Engineering* 2004; 10(5/6):955-63.

15. www.atelocell.com.

16. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963; 197:452-4..

17. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 1963; 62: 327-36.

18. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg*. 2005 Sep-Oct;34(5):415-23.

19. Deng MJ, Jin Y, Shi JN, Lu HB, Liu Y, He DW, et al. Multilineage differentiation of ectomesenchymal cells isolated from the first branchial arch. *Tissue Eng*. 2004 Sep-Oct; 10(9-10):1597-606.

20. Smiler D, Soltan M, Lee JW. A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. *Implant Dent*. 2007 Mar; 16(1):42-53.

21. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992; 13:69–80.

- 22. Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J.** Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 1993; 82:66 -76.
- 23. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-147.
- 24. Conget PA, Minguell JJ.** Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999; 181:67-73.
- 25. Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, et al.** Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 2005; 106:419-27.
- 26. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, et al.** HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31:890-96.
- 27. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J.** Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* 2007; 25:2739-49.
- 28. Ploemacher RE, Piersma AH, Brockbank KG.** The nature and function of granulopoietic microenvironments. *Blood Cells* 1984; 10:341.
- 29. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN:** Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4:267.
- 30. Prockop DJ.** Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276:71.
- 31. Caplan AI.** The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994; 21:429.
- 32. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV.** Bone marrow osteogenic stem cells: In vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20:263.
- 33. Keating A, Horsfall W, Hawley RG, et al.** Effect of different promoters on expression of genes introduced into hematopoietic and marrow stromal cells by electroporation. *Exp Hematol* 1990; 18:99.

- 34. Wakitani S, Saito T, Caplan AI:** Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995; 18:1417.
- 35. Allais M.** Estudio comparativo del uso de cemento de fosfato de cálcico asociado a células madre adultas de médula ósea en el proceso de reparación ósea. Tesis de doctorado, Universidad de Pernambuco, 2008.
- 36. Maurette P.** Evaluación del uso del cultivo de células madre adultas de médula ósea diferenciadas in vitro en osteoblastos, asociada a matriz ósea bovina desmineralizada versus injerto óseo autógeno, en el proceso de reparación ósea de defectos críticos en calota de ratas. Tesis doctoral. Universidad de Pernambuco, 2008.
- 37. Caterson EJ, Nesti LJ, Danielson KG, Tuan RS.** Human marrow derived mesenchymal progenitor cells: Isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. *Mol Biotechnol* 2002; 20:245.
- 38. Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH.** Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 2002; 20:249.
- 39. Tuan RS, Boland G, Tuli R.** Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5:32.
- 40. Young HE, Steele TA, Bray RA, et al.** Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 2001; 264:51.
- 41. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW.** Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 2004; 32:414.
- 42. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al.** Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838.
- 43. Kaplan KL, Broekman MJ, Chernoff A, Lesznik GR, Drillings M.** Platelet alphagranule proteins: studies on release and subcellular localization. *Blood* 1979; 53:604-18.
- 44. Creeper F, Lichanska AM, Marshall RI, Seymour GJ, Ivanovski S.** The effect of platelet-rich plasma on osteoblast and periodontal ligament cell migration, proliferation and differentiation. *J Periodontal Res.* 2009 Apr; 44(2):258-65.

- 45. Butterfield KJ, Bennett J, Gronowicz G, Adams D.** Effect of Platelet-Rich Plasma With Autogenous Bone Graft for Maxillary Sinus Augmentation in a Rabbit Model. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:370-76.
- 46. Whitman DH, Berry RL, Green DM.** Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Nov; 55(11):1294-9.
- 47. Marx RE, Carlson ER, Eichstracelt RM, Schimmele SR, Stracess JE, Georgeff KR.** Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1998 Jun; 85(6):638-46.
- 48. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Aleksic Z, Kenney EB.** Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcations in humans. *J Clin Periodontol* 2003; 30:746-51.
- 49. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG.** Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects. An animal study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 60:1176-81.
- 50. Kassolis JD, Reynolds MA.** Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. *J Craniofac Surg* 2005; 16:280-87.
- 51. Goto H, Matsuyama T, Miyamoto M, Yonamine Y, Izumi Y.** Platelet-rich plasma/ osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation following subcutaneous transplantation. *J Periodont Res* 2006; 41:455-62.
- 52. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB.** A reentry study on the use of bovine porous bone mineral, GTR, and platelet-rich plasma in the regenerative treatment of intrabony defects in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005; 25:49-59.
- 53. Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T.** Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63:362-69.
- 54. Kandler B, Fugl A, Gabriele M.** Bone marrow stromal cells supernatant and bone morphogenetic protein-6 in vitro. *J Periodontol* 2006; 77:699.

- 55. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati E, et al.** Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003; 24:3095.
- 56. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, et al.** Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15:589.
- 57. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB.** Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res* 2002; 37:300-06.
- 58. Hatakeyama M, Beletti ME, Zanetta-Barbosa D, Dechichi P.** Radiographic and histomorphometric analysis of bone healing using autogenous graft associated with platelet-rich plasma obtained by 2 different methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105:e13-e18.
- 59. Dori F, Huszar T, Nikolidakis D, Arweiler NB, Gera I, Sculean A.** Effect of platelet-rich plasma on the healing of intra-bony defects treated with a natural bone mineral and a collagen membrane. *J Clin Periodontol* 2007; 34:254-61.
- 60. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, et al.** Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol*. 2006 Jun; 77(6):1003-7.
- 61. George J, Kuboki Y, Miyata T.** Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. *Biotechnol Bioeng*. 2006 Oct; 95(3):404-11.
- 62.** www.kokenmpc.co.jp/english/index.html.
- 63. Wu W, Chen F, Liu Y, Ma Q, Mao T.** Autologous Injectable Tissue-Engineered Cartilage by Using Platelet-Rich Plasma: Experimental Study in a Rabbit Model. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65:1951-57.
- 64. Flecknell, P.A.** Euthanasia. In: *Laboratory Animals*. Edited by: Tuffery, A.A. Second Edition. John Wiley & Sons Ltd. 1995; 375-82.
- 65. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council.** Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press. Washington, D.C. 1996.

- 66. Manning, P.J, Ringler, D.H., Newcomer C.E.** The Biology of the Laboratory Rabbit. Second Ed. Academic Press, San Diego, 1994. 483p.
- 67. Schmitz JP, Hollinger JO.** The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat Res 1986 Apr; (205):299-308.
- 68. Thomaidis V, Kazakos K, Lyras DN, Dimitrakopoulos I, Lazaridis N, Karakasis D, et al.** Comparative study of 5 different membranes for guided bone regeneration of rabbit mandibular defect beyond critical size. Med Sci Monit. 2008; 14(4): BR67-73.
- 69. Jianqui H, Hong H, Lieping S, Gengbua G.** Comparison of Calcium Alginate Film With Collagen Membrane for Guided Bone Regeneration in Mandibular Defects in Rabbits. J Oral Maxillofac Surg 2002 60:1449-54.
- 70. Niemeyer P, Krause U, Kasten P, Kreuz PC, Henle P, Südkamp NP, et al.** Mesenchymal Stem Cell-Based HLA-Independent Cell Therapy for Tissue Engineering of Bone and Cartilage. Current Stem Cell Research & Therapy 2006; 1: 21-27.
- 71. Lane JM, Tomin E, Bostrom MP.** Biosynthetic bone grafting, Clin. Orthop. Relat. Res 1999; 367 (Supl.): 107-17.
- 72. Arinzech TL, Peter SJ, Archambault MP, Van den Bos C, Gordon S, Kraus K, et al.** Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect, J. Bone Joint Surg. Am. 2003; 85A: 1927-35.
- 73. Liu GP, Zhao L, Cui L, Liu W, Cao Y.** Tissue-engineered bone formation using human bone marrow stromal cells and novel β -tricalcium phosphate, Biomed. Mater. 2007, 2:78–86.
- 74. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, et al:** The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. J Bone Joint Surg Am 1998; 80:985.
- 75. Dai KR, Xu XL, Tang TT, Zhu ZA, Yu CF, Lou JR, et al.** Repairing of goat tibial bone defects with BMP-2 gene-modified tissue-engineered bone, Calcif. Tissue Int. 2005;77:55–61.
- 76. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, et al.** Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite

ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones, *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 49:328-37.

77. Marei M, Nouh S, Saad M, Ismail N. Preservation and Regeneration of Alveolar Bone by Tissue-Engineered Implants. *Tissue Engineering* 2005; 11 (5/6): 751-66.