



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**800 AÑOS**  
VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA  
1218 - 2018

# **GRADO EN MEDICINA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

---

***EVALUACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL EN  
RATA DIRIGIDO A LA REGENERACIÓN ÓSEA CON  
CÉLULAS MADRE OBTENIDAS DE PULPA DENTAL***

*Review of an experimental model in rat aimed at bone regeneration with  
dental pulp stem cells*

---

Alumna: **Laura Martín Gil**

Dirigido por **M<sup>a</sup> Begoña García Cenador**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO – Junio de 2020**

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA .....</b>	<b>1</b>
1.2	<b>TERAPIAS CONVENCIONALES.....</b>	<b>2</b>
1.3	<b>ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO.....</b>	<b>3</b>
1.3.1	<i>TERAPIA CELULAR.....</i>	<i>3</i>
1.3.2	<i>INGENIERÍA DE TEJIDOS.....</i>	<i>3</i>
1.4	<b>PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA INGENIERÍA DEL TEJIDO ÓSEO .....</b>	<b>3</b>
1.5	<b>LAS CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES (MSC).....</b>	<b>4</b>
1.5.1	<i>CONCEPTO Y ANTECEDENTES.....</i>	<i>4</i>
1.5.2	<i>FUENTES DE OBTENCIÓN DE MSC .....</i>	<i>5</i>
1.5.3	<i>MSC DENTALES Y SUS PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....</i>	<i>5</i>
1.5.4	<i>PERSPECTIVAS SOBRE EL USO TERAPÉUTICO DE LAS MSC.....</i>	<i>6</i>
1.5.5	<i>APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS MSC DENTALES(22)(TABLA 5): .....</i>	<i>7</i>
1.6	<b>ESTRATEGIAS DE LA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO .....</b>	<b>7</b>
1.6.1	<i>BASES FISIOLÓGICAS DE LA REGENERACIÓN ÓSEA.....</i>	<i>7</i>
1.6.2	<i>LA REGENERACIÓN ÓSEA.....</i>	<i>9</i>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
3.1	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>11</b>
3.2	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
4.1	<b>ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.....</b>	<b>12</b>
4.2	<b>MATERIAL BIOLÓGICO: OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS .....</b>	<b>12</b>
4.2.1	<i>OBTENCIÓN DEL TEJIDO PULPAR .....</i>	<i>12</i>

4.2.2	<i>DISGREGACIÓN ENZIMÁTICA</i> .....	13
4.2.3	<i>CULTIVO Y EXPANSIÓN CELULAR</i> .....	13
4.2.4	<i>CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN</i> .....	14
<b>4.3</b>	<b>MATRICES TRIDIMENSIONALES O SCAFFOLDS</b> .....	<b>14</b>
<b>4.4</b>	<b>MODELO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL</b> .....	<b>14</b>
4.4.1	<i>DISEÑO EXPERIMENTAL, ANIMALES Y GRUPOS</i> .....	14
4.4.2	<i>TÉCNICA ANESTÉSICA</i> .....	15
4.4.3	<i>TÉCNICA QUIRÚRGICA</i> .....	15
4.4.4	<i>COMPROBACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR</i> .....	18
4.4.5	<i>ESTUDIO RADIOLÓGICO</i> .....	18
4.4.6	<i>ESTUDIO HISTOLÓGICO</i> .....	19
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
<b>5.1</b>	<b>OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL (DPSC)</b> .....	<b>20</b>
5.1.1	<i>ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR</i> .....	21
<b>5.2</b>	<b>RESULTADOS IN VIVO EN EL MODELO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL</b> .....	<b>21</b>
5.2.1	<i>CIRUGÍA</i> .....	21
5.2.2	<i>COMPROBACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR EN LOS IMPLANTES</i> .....	21
5.2.3	<i>ANÁLISIS RADIOLÓGICO</i> .....	21
5.2.4	<i>ESTUDIO HISTOLÓGICO</i> .....	23
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>29</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>30</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> CARACTERÍSTICAS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE INJERTO. ....	2
<b>TABLA 2.</b> ELEMENTOS FUNDAMENTALES EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS .....	4
<b>TABLA 3.</b> ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN CON MSC.....	5
<b>TABLA 4.</b> ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN CON DPSC .....	6
<b>TABLA 5.</b> APLICACIONES CLÍNICAS EN EL MOMENTO ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE FUTURO EN EL USO DE DPSC.....	7
<b>TABLA 6.</b> TIPOS CELULARES PRESENTES EN EL TEJIDO ÓSEO. ....	8
<b>TABLA 7.</b> FASES DE LA REGENERACIÓN ÓSEA. ....	9
<b>TABLA 8.</b> DISTRIBUCIÓN DE LOS ANIMALES.....	15
<b>TABLA 9.</b> DISTRIBUCIÓN DE MATERIALES EMPLEADOS EN CADA UNO DE LOS GRUPOS. ....	16
<b>TABLA 10.</b> MATERIAL PARA EL PROCESADO DE LAS MUESTRAS.....	19
<b>TABLA 11.</b> PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU ESTUDIO HISTOLÓGICO. ....	19
<b>TABLA 12.</b> EVIDENCIAS RADIOLÓGICAS EN EL GRUPO C A LOS 3 Y 6 MESES.....	22
<b>TABLA 13.</b> RESULTADOS DEL ESTUDIO HISTOLÓGICO EN LOS DIFERENTES GRUPOS. ....	24
<b>TABLA 14.</b> RESUMEN DE MATERIALES Y RESULTADOS POR GRUPOS. ....	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> ACCESO A LA CRESTA DE INSERCIÓN. OSTECTOMÍA CIRCULAR CON FRESA TREFINA. .....	16
<b>FIGURA 2.</b> PROCEDIMIENTOS EN LOS TRES GRUPOS: GRUPO C, GRUPO G+M, GRUPO G+M+S. 17	
<b>FIGURA 3.</b> HEMIMANDÍBULAS RECIÉN EXTIRPADAS: SE OBSERVA EL DEFECTO REALIZADO CON LA TREFINA. ....	17
<b>FIGURA 4.</b> EXTRACCIÓN DE LAS PULPAS. ....	20
<b>FIGURA 5.</b> IMAGEN RADIOLÓGICA DE UN DEFECTO DEL GRUPO C A LOS 3 MESES.....	22
<b>FIGURA 6.</b> IMAGEN RADIOLÓGICA DE UN DEFECTO DEL GRUPO C A LOS 6 MESES. FLECHA ROJA: TRANSFORMACIÓN DEGENERATIVA DENTARIA.....	22
<b>FIGURA 7.</b> REACCIÓN FIBROSA DE UNA LESIÓN SIN TRATAMIENTO.....	23
<b>FIGURA 8.</b> HEMATOXILINA/EOSINA DEL DEFECTO ÓSEO A LOS TRES MESES .....	23
<b>FIGURA 9.</b> HEMATOXILINA/EOSINA DEL DEFECTO ÓSEO A LOS SEIS MESES.....	24

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**MSC:** MESENCHYMAL STEM CELL (CÉLULA MADRE MESENQUIMAL)

**DPSC:** DENTAL PULP STEM CELL (CÉLULA MADRE DE PULPA DENTAL)

**VEGF:** VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL)

**FGF:** FIBROBLAST GROWTH FACTOR (FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS)

**PDGF:** PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR (FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS)

**PRP:** PLATELET RICH PLASMA (PLASMA ENRIQUECIDO CON PLAQUETAS)

**BMP:** BONE MORPHOGENETIC PROTEINS (PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS)

**MO:** MÉDULA ÓSEA

**ALP:** ALKALINE PHOSPHATASE (FOSFATASA ALCALINA)

**CFU-GM:** COLONY-FORMING UNIT-GRANULOCYTE MACROPHAGE (UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACRÓFAGOS)

**TRAP:** TARTRATE-RESISTANT ACID PHOSPHATASE (FOSFATASA ÁCIDA TARTRATO-RESISTENTE)

**OPN:** OSTEOPONTIN (OSTEOPONTINA)

**OCN:** OSTEOCALCIN (OSTEOCALCINA)

**BSP:** BONE SIALOPROTEIN (SIALOPROTEÍNA ÓSEA)

**PTH:** PARATHYROID HORMONE (HORMONA PARATIROIDEA)

**TGF- $\beta$ 1 Y 2:** TRANSFORMING GROWTH FACTORS BETA 1 & 2 (FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA 1 Y 2)

**IGF-I:** INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 (FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO 1)

**SBF:** SUERO BOVINO FETAL

**DMEM:** DULBECCO'S MODIFIED EAGEL MEDIUM®

**PBS:** PHOSPHATE BUFFERED SALINE (TAMPÓN FOSFATO SALINO)

**NTB:** CLORURO DE NITROBLUE TETRAZOLIUM

**BCIP:** 5-BROMO-4-CLORO-3-INDOLIL-FOSFATO

**HA:** HIDROXIAPATITA

**SHAM:** GRUPO CONTROL

**CT:** TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

**VE:** VESÍCULAS EXTRACELULARES

## **RESUMEN**

El incremento en la incidencia de fracturas y patología asociada a la pérdida de masa ósea hace necesaria más investigación sobre el proceso osteogénico. Los injertos, especialmente autólogos, eran considerados la opción terapéutica estándar, pero el desarrollo de nuevos biomateriales y los avances en terapia celular han convertido a la bioingeniería de tejidos en la mejor alternativa, al subsanar sus complicaciones. Está demostrado que la aplicación de células madre mesenquimales (MSC) sobre biomateriales que integran factores de crecimiento, acelera significativamente la regeneración y favorece la diferenciación. Las células mesenquimales de pulpa dental (DPSC) han ido ganando merecido protagonismo y hoy son objeto de numerosos estudios experimentales por su carácter pluripotencial, fácil acceso y biodisponibilidad, propiedades que las convierten en una fuente segura de estudio. Esta investigación trata de encontrar un sustituto óseo ideal a partir del cual se puedan establecer protocolos reproducibles que faciliten y agilicen los procesos de diferenciación osteogénica con seguridad y que sean aplicables en la práctica clínica. Para ello, hemos analizado los cambios histológicos y radiológicos en diferentes grupos de ratas a las que previamente habíamos provocado un defecto óseo crítico mandibular. Se ha estudiado la evolución del tejido en tres situaciones: sin tratamiento, aplicando el sustituto óseo OsteoBiol® Gen-Os®; y combinando Gen-Os® y DPSC. Compararemos la actividad osteogénica de cada grupo; y determinaremos el papel y la implicación de cada material en la regeneración tisular. Las conclusiones resultan prometedoras y se demuestra nuevamente la función trascendental de las DPSC, con gran perspectiva de futuro.

## **PALABRAS CLAVE**

MSC, DPSC, Bioingeniería, Biomateriales, Ingeniería de Tejidos, Osteogénesis, Injerto óseo, Matriz Tridimensional, Alopásticos, Sustituto Óseo, Defecto Óseo, Pulpa Dental, Células Madre, Angiogénesis, Regeneración Ósea.

## **ABSTRACT**

The increase in the incidence of fractures and bone loss-associated pathology makes more research needed on the osteogenic process. Bone grafts, specifically autologous ones, were considered the standard therapeutic option, but the development of new biomaterials and the progress in cell-based therapies have made tissue bioengineering the best alternative, as it overcomes their complications. It is demonstrated that mesenchymal stem cells (MSC) application to biomaterials that embed growth factors, accelerates regeneration significantly and facilitates differentiation. Dental pulp stem cells (DPSC) have been gaining deserved importance and, today, they are the subject of many experimental studies due to their pluripotential nature, easy access and bioavailability, properties that made them a reliable source of research. This study tries to find an optimal bone substitute from which we could establish reproducible protocols that facilitate and speed up processes of osteogenic differentiation safely; and which are suitable in clinical practice. For that, we have analyzed histological and radiologic changes in different groups made up of rats that had previously caused a critical jaw bone defect. The tissue evolution have been studied in three situations: without any treatment, applying bone substitute OsteoBiol® Gen-Os®; and combining Gen-Os® and DPSC. Osteogenic activity will be compared between each group; and the role and involvement of each material in tissue regeneration will be determined. Conclusions look promising and it is once again demonstrated the key role of DPSC, with a huge future perspective.

## **KEYWORDS**

MSC, DPSC, Bioengineering, Biomaterials, Tissue Engineering, Osteogenesis, Bone Graft, Scaffold. Alloplastics, Bone Substitute, Bone Defect, Dental Pulp, Stem Cells, Angiogenesis, Bone Regeneration.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

La regeneración tisular tiene mucho potencial al ser de extraordinaria utilidad en medicina aplicada. Contamos con diferentes biomateriales disponibles, avanzados conocimientos en células madre(1–6) y la evidencia de que los factores de crecimiento favorecen la diferenciación y aceleran estos procesos(7,8). El presente trabajo trata de evaluar un modelo experimental de regeneración ósea de defecto mandibular en rata utilizando células madre de origen mesenquimal (MSC) obtenidas de material pulpar. Trataremos de encontrar un sustituto biológico ideal para regenerar defectos óseos críticos incrementando el potencial de las MSC a partir de soportes biológicos con una alta concentración de factores osteogénicos.

La necesidad de esta investigación atiende a la situación actual del problema: numerosos estudios demuestran que muchas patologías y la toma de fármacos están asociados con la pérdida de masa ósea(9–16); sumado a una vida cada vez más sedentaria en los países desarrollados, afectando al metabolismo óseo(17). Un estudio reciente demuestra un incremento en la incidencia de pérdida de masa ósea en adultos a partir de los 40, predisponiendo a fracturas en ambos sexos por igual(18), aunque en otros estudios las mujeres serían las más afectadas(19). En España, según la *International Osteoporosis Foundation*, en 2015 la prevalencia de pérdida de densidad ósea en mayores de 50 años era del 22,5% en mujeres y 6,8% en hombres; se produjeron más de 330.000 fracturas por fragilidad en 2017(19). Esto supone un grave problema sanitario y de gestión, con más de 4.200 millones de euros invertidos en recursos(19). Eso es así teniendo en cuenta pacientes diagnosticados de osteoporosis, pero la cifra real asciende al incluir a pacientes con patología por consumo de fármacos, estilo de vida sedentario u otras enfermedades, pudiendo estar infradiagnosticada. Además, hasta el 5-10% de las fracturas no se resuelven espontáneamente, en algunos casos hasta el 50% de ellas(20).

La investigación en biomateriales y bioingeniería está aumentando en estos años. Se trabaja en nuevos soportes y con terapia celular de diferentes estirpes. En este ensayo trataremos MSC de pulpa dental (DPSC): MSC accesibles y con mucho potencial(21–

23). Desarrollando un modelo quirúrgico, trataremos de establecer un protocolo seguro que facilite la osteogénesis y garantice su éxito con mínimas complicaciones.

## 1.2 TERAPIAS CONVENCIONALES

La terapia convencional más empleada en regeneración tisular es el injerto, de los que existen varios tipos(24–30)(**Tabla 1**):

**Tabla 1.** Características de los diferentes tipos de injerto.

	<i>Injertos autólogos</i>	<i>Injertos heterólogos / Xenoinjertos</i>	<i>Injertos homólogos / aloinjertos</i>	<i>Injertos aloplásticos / biomateriales</i>
<b>Origen</b>	Material biológico del paciente (hueso cortical, esponjoso o ambos).	Material biológico de una especie diferente (bovina, porcina o equina).	Material biológico de donante de la misma especie. Sin células viables.	Material inerte, no orgánico. En regeneración ósea suelen usar base de calcio
<b>Propiedades</b>	Se recomienda aprovechar su vascularización en defectos mayores de 5 cm (en humanos).  Matriz rica en proteínas de señalización.	Capacidad osteoinductiva (reducida).	Osteoconducción y osteoinducción.	Osteoconductor y osteogénico.  Sus propiedades varían con su porosidad, reabsorción, fabricación y cristalinidad; se complementan con factores de crecimiento.
<b>Ventaja principal</b>	Gold estándar. Muy osteogénico, osteoconductor y osteoinductor.  Evita reacciones inmunológicas.	Biodisponibilidad.  Diferenciación hacia tejido óseo estable en cirugía maxilofacial.	Biodisponibilidad elevada gracias a los bancos de huesos y tejidos.	Muchos son no reabsorbibles o de absorción lenta (estables para la regeneración ósea).  Especificidad.
<b>Inconveniente</b>	Reabsorción relativamente rápida (necesidad de materiales más estables).  Biodisponibilidad.  Infecciones.	Alta antigenicidad.  Requiere procesos de esterilización para evitar reacción inmunológica o infección, disminuyendo la osteoconducción.	Potencial reducido al no contar con sus propias células viables.  Posibilidad de rechazo inmunológico e infección.	Necesidad de establecer protocolos para cada tipo de material.
<b>Papel en la actualidad</b>	El éxito con este tipo de injertos se sitúa alrededor del 91%.	Los de origen bovino (sobre todo) se usan con éxito en cirugía maxilofacial (alveolar y mandibular).	Cada vez más desestimado por rechazo inmunológico.	Están adquiriendo un papel cada vez más relevante en la regeneración de diferentes tejidos
<b>Otra información</b>	Tras necrosarse, pasa por varios estados de reabsorción y acaba siendo el soporte de nuevo hueso.	Se necesitan realizar estudios en mayor profundidad.	Estudios plantean la alteración del componente inmunológico del tejido; o los mecanismos inmunológicos del receptor para garantizar la viabilidad. Actualmente, no es rentable someter a procesos de inmunosupresión, disponiendo de materiales más inocuos.	Utilizamos OsteoBiol® Gen-Os®, sustituto óseo de reabsorción lenta y con colágeno (ayuda a formar el coágulo y favorece la colonización por DPSC).

### **1.3 ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO**

#### **1.3.1 Terapia celular**

La terapia celular utiliza células madre como instrumento terapéutico para el tratamiento de enfermedades.

Se puede aplicar en diferentes ámbitos de la medicina, como en la regenerativa.

Su objetivo es sustituir células dañadas por células nuevas que se obtienen de cultivos *in vitro* a partir de una fuente humana o animal.

#### **1.3.2 Ingeniería de tejidos**

Definiremos este concepto en el [punto 1.4](#).

### **1.4 PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA INGENIERÍA DEL TEJIDO ÓSEO**

Surgió en los años 80 y se basa en un equipo multidisciplinar donde la biología molecular, la bioingeniería y la medicina, además de otras especialidades, son indispensables.

Actúa como un espejo del organismo. Estudia los procedimientos orgánicos (como la auto-reparación), tratando de imitarlos y reproducirlos con materiales sintéticos. Su objetivo de reparar funciones o incluso mejorarlas cuando el organismo no es capaz por sí mismo.

Las células, los *scaffolds* (soportes o matrices tridimensionales) y los factores de crecimiento son sus elementos clave(4), además de un ambiente físico-químico apropiado(**Tabla 2**):

**Tabla 2.** Elementos fundamentales en la ingeniería de tejidos(5,31,32).

<i>Matrices tridimensionales</i>	<i>Células mesenquimales (MSC)</i>	<i>Factores de crecimiento</i>
Actúa como soporte para el proceso regenerativo, y necesita contar con propiedades para la osteogénesis.	Células madre adultas no hematopoyéticas con capacidad para <i>autorenovarse</i> y <i>diferenciarse</i> en distintas estirpes celulares.	Proteínas capaces de estimular el <i>crecimiento celular</i> ; su <i>migración</i> , <i>proliferación</i> y <i>diferenciación</i> (papel trascendental).
Tipos: - <i>Origen biológico</i> (se someten a procesos químicos) - <i>Origen sintético</i> (con base de calcio para regeneración ósea)	Su papel y expectativas son tantas que las describiremos en profundidad en el apartado 1.5.	Los avances científicos hacen posible que los encontremos <i>aislados</i> y <i>listos</i> para ser utilizados en beneficio de la bioingeniería.
<i>Funciones</i> principales:  - Estructura que conecta células y tejidos; y las guía para diferenciarse. - Soporte y transporte de moléculas de señalización hacia el defecto óseo. - Liberación constante de factores osteoinductivos. - Contribuye a la proliferación, diferenciación y metabolismo de hueso. - Hace que las células se identifiquen y adhieran selectivamente unas a otras en lugares específicos de su superficie.		Los más importantes:  - <i>VEGF</i> : factor de crecimiento vascular endotelial. - <i>FGF</i> : factor de crecimiento de fibroblastos. - <i>PDGF</i> : factor de crecimiento derivado de plaquetas. - <i>PRP</i> : plasma enriquecido con plaquetas. - <i>BMP</i> : proteínas morfogenéticas óseas (familia de las TGF- $\beta$ que estimulan la formación de hueso, cartilago y tejido conjuntivo).
En este estudio utilizaremos OsteoBiol® Gen-Os®.		Muchas matrices integran uno o varios factores.

## 1.5 LAS CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES (MSC)

### 1.5.1 Concepto y antecedentes

Las MSC son células madre adultas no hematopoyéticas que se obtienen de una fuente humana o animal.

Tienen capacidad de *autorenovarse* y *diferenciarse* en células mesodérmicas (adipocitos, condrocitos, osteocitos), ectodérmicas (neurocitos) o endodérmicas (hepatocitos)(33).

Han sido objeto de estudio desde hace años (**Tabla 3**):

**Tabla 3.** Antecedentes históricos de la investigación con MSC(6,33–36).

<b>Cronología</b>	<b>Acontecimientos</b>
<b>A partir de los años 50</b>	Las primeras investigaciones con células madre se centraban, sobre todo, en las de origen hematopoyéticos.
<b>A partir de los años 70</b>	Se empezó a experimentar con MSC, seducidos por su capacidad para formar el estroma medular. En 1976 cuando Friedenstein et al. describieron por primera vez este tipo de células. En su investigación, consiguieron aislar, a partir de médula ósea de ratón, unas células capaces de adherirse al medio de cultivo y, a su vez, las unas a las otras, formando husos de colonias. De hecho originalmente se denominaron “células formadoras de colonias de fibroblastos”. Estas células forman la microarquitectura medular, y el interés en comprender su organización justificó los estudios posteriores.
<b>A partir de los años 80</b>	A esta década debemos la denominación actual de estas células. Durante esta década, se descubrió su gran potencial para diferenciarse, sobre todo, en células mesodérmicas, que fue descrito en ensayos con ratas. En estos estudios, también se consiguió que proliferaran y se pudieran estudiar <i>in vitro</i> .
<b>Década de los 2000</b>	Se empiezan a desarrollar biomateriales válidos como soporte para la regeneración de tejidos a partir de células como las MSC. Estas matrices tratan de imitar el microambiente <i>in vivo</i> en el que se desarrolla un tejido y su objetivo es dar soporte, también, a la vascularización que se origine simultáneamente. Encontrar materiales idóneos suponía no tener que recurrir a trasplantes de hueso autólogo (disponibilidad limitada) o alogénico (capacidad osteogénica menor); y disponer al mismo tiempo de un material biocompatible que represente las mínimas complicaciones postoperatorias.
<b>2013</b>	Se describe una cierta capacidad de inmunomodulación en las MSC, tras la revisión de varios ensayos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Se comprobó que son capaces de reducir las respuestas inmunológicas excesivas de células T, B, natural killer, células dendríticas y macrófagos.
<b>Actualidad</b>	Son numerosos los estudios con MSC y se han convertido en una fuente habitual de terapia celular, medicina regenerativa y reparación de tejidos.

### 1.5.2 Fuentes de obtención de MSC

La mayor población de MSC está en médula ósea (MO), pero también existen en tejido adiposo, pulpa dental, endometrio, placenta o sangre periférica.

Su obtención a partir de MO y tejido adiposo es lo habitual, pero cada vez más ensayos aprovechan el material pulpar(21,37–39): muy accesible y no requiere intervenciones agresivas. Además, los dientes son desechos biológicos y es relativamente sencillo encontrar donantes(21).

### 1.5.3 MSC dentales y sus propiedades biológicas

La función biológica del material de la cámara pulpar es reparar dentina y esmalte; y se empezó a estudiar a principios del siglo XX(Tabla 4).

**Tabla 4.** Antecedentes históricos de la investigación con DPSC(40–43).

<i>Cronología</i>	<i>Acontecimientos</i>
<i>Principios de S.XX</i>	Hasta prácticamente los años 60 no se dio valor a las piezas dentales. No se estudiaban y se desechaban en cuanto había sospecha de patología asociada
<i>A partir de los años 60</i>	<p>Su estudio empieza a adquirir relevancia. El material pulpar se estudia por primera vez histológicamente y se detecta una zona de gran celularidad correspondiente a las MSC. Esto supuso un cambio de perspectiva y se empezó a apostar por su potencial regenerativo, aunque inicialmente sólo a nivel odontológico.</p> <p>Durante estos años, también tiene lugar ensayos clínicos con MSC de otras fuentes que ayudarán en el conocimiento de las DPSC como parte de ese conjunto celular. El poder osteogénico de las MSC se comprobó por primera vez con un ensayo clínico con ratones que reportó resultados satisfactorios en trasplante de MSC de médula ósea y que ya hemos mencionado anteriormente.</p> <p>En 1963 se demostró que el potencial de diferenciación de las DPSC hacia tejido óseo era mayor al de MSC de otro origen, incluso inducidas por factores osteogénicos.</p>
<i>S. XXI - Actualidad</i>	Desde principios de siglo y, sobre todo, a partir de 2012, se empezaron a llevar a cabo estudios específicos con DPSC para estudiar sus propiedades. En uno de ellos se demuestra que las DPSC tienen más potencial para desarrollar tejido mineralizado que otras (como las MSC de origen medulares o adiposo). Toda la información que tenemos a partir de estas investigaciones, sumado a su fácil acceso, las convierte en una fuente de estudio muy empleada en la actualidad.

Las DPSC son pluripotenciales y capaces de diferenciarse en tipos celulares como condrocitos, adipocitos o hepatocitos(44). Además, presentan capacidad inmunomoduladora(21).

#### **1.5.4 Perspectivas sobre el uso terapéutico de las MSC**

Su uso terapéutico está actualmente relacionado con enfermedades crónicas: autoinmunes, neurodegenerativas y cardiovasculares (isquémicas); y con enfermedades genéticas tipo osteogénesis imperfecta. También se utilizan con éxito en regeneración y reparación de tejidos como cartílago y huesos largos(36).

El objetivo de las investigaciones con MSC es conseguir el control de la actividad celular sobre los diferentes *scaffolds* disponibles y dar con una combinación ideal: mayor compatibilidad y beneficio para el paciente, reduciendo el impacto negativo de la intervención(36). Poder establecer protocolos sobre su uso en un entorno seguro, facilitará su aplicación y se alcanzarán mejores resultados. También hay estudios dirigidos a desarrollar técnicas estandarizadas de extracción y cultivo de MSC(22).

### 1.5.5 Aplicaciones clínicas de las MSC dentales(22)(Tabla 5):

**Tabla 5.** Aplicaciones clínicas en el momento actual y perspectivas de futuro en el uso de DPSC.

<i>Momento actual</i>	<i>Perspectivas de futuro</i>
<i>Odontología</i> (reemplazo de piezas, incluyendo la raíz).	Establecer protocolos que faciliten el desarrollo <i>in vitro</i> de diferentes tipos celulares para diversos tratamientos.
<i>Neurología</i> (lesiones nerviosas periféricas).	Ej. Estudios como el nuestro: establecer un protocolo de diferenciación osteogénica para poder reconstruir un defecto óseo mandibular.
<i>Angiología</i> (estimulan la angiogénesis y ayudan en la prevención de accidentes isquémicos).	
<i>Endocrinología</i> (Diabetes Mellitus).	

## 1.6 ESTRATEGIAS DE LA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO

Cada tipo de injerto tiene sus ventajas e inconvenientes. Ante la escasa biodisponibilidad de injertos autólogos; la baja capacidad osteoinductiva de los xenoinjertos; y el rechazo en aloinjertos, los biomateriales se alzan como la opción ideal.

### 1.6.1 Bases fisiológicas de la regeneración ósea

#### 1.6.1.1 Histofisiología ósea

El hueso es tejido conjuntivo mineralizado, muy estable, que da soporte a las partes blandas del cuerpo y sirve de inserción a los músculos. Está muy vascularizado e innervado, y se estructura en laminillas de matriz osteoide calcificada. Distinguimos dos zonas en función de la disposición de las laminillas: la cortical (disposición concéntrica); y el hueso esponjoso (disposición en forma de red donde está la MO)(45).

#### A. Tipos celulares(45,46)(Tabla 6)

**Tabla 6.** Tipos celulares presentes en el tejido óseo.

<b><i>Osteoblastos</i></b>	<b><i>Osteocitos</i></b>	<b><i>Osteoclastos</i></b>
<p><i>Células inmaduras</i>, derivadas de MSC (origen: MO).</p> <p>Se diferenciarán en osteocitos o en células limitantes que forman el endostio, capa que protege al hueso.</p>	<p>Los osteoblastos que quedan rodeados de matriz mineralizada en las “lagunas óseas”, pasan a ser osteocitos, <i>células maduras</i>. Las <i>más abundantes en hueso maduro</i> y el <i>estadio final</i> de la línea osteoblástica.</p>	<p>Células multinucleadas de <i>mayor tamaño</i>.</p>
<p>Especializadas en la <i>síntesis de matriz ósea</i>; y la remodelación y crecimiento óseo.</p>	<p>Su función principal es <i>controlar el remodelado óseo</i> y mantener la matriz ósea.</p>	<p>Se encargan de la <i>destrucción de tejido óseo</i> y de su <i>reabsorción</i>.</p>
<p>Sintetizan <i>proteínas colágenas</i> y <i>no colágenas</i> de la matriz orgánica del hueso.</p>	<p>Se sitúan en la parte <i>más interna</i> del hueso.</p>	<p>Son ricas en <i>mitocondrias</i> y <i>vacuolas</i>.</p>
<p>Dirigen la <i>disposición de las fibrillas</i> en la matriz extracelular y cuando se alinean forman una fina capa de matriz ósea sin mineralizar, el <i>osteóide</i>, que madura cuando se depositan sobre ella sales de calcio.</p>	<p>Se comunican con los osteoblastos a través de <i>proteínas transmembrana</i> (permiten el paso de calcio, citoquinas o prostaglandinas).</p>	<p>Su origen sí es <i>hematopoyético</i>, surgen a partir de las unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (<i>CFU-GM</i>).</p>
<p>Contribuyen en la <i>mineralización de la sustancia osteoide</i> gracias a la fosfatasa alcalina (ALP).</p>	<p>Tienen forma estrellada y sus prolongaciones (<i>canaliculos óseos</i>) discurren por la matriz y nutren al hueso, transportando metabolitos desde los capilares.</p>	<p>Contienen <i>fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP)</i> que es la que permite la desfosforilación de las proteínas.</p>
<p><i>Median en la reabsorción</i> por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas.</p>	<p>Sus prolongaciones forman una <i>red de interconexiones</i> con gran superficie de contacto.</p>	<p><i>Marcadores</i>: identificamos estas células midiendo la actividad de TRAP <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.</p>
<p>Sintetizan <i>factores de crecimiento</i>.</p>	<p>Cuando se produce un trauma, se produce <i>hipoxia</i> y <i>necrosis</i> de los osteocitos que estén a más de 0,1 mm de cualquier capilar</p>	
<p><i>Marcadores</i>: Cbfa1 o Runx2 (el primero indica diferenciación osteogénica en preosteoblastos), osteopontina (OPN), colágeno I, fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OCN) y sialoproteína ósea (BSP), los dos últimos aparecen con la mineralización. Las células limitantes expresan a veces el receptor de parathormona (PTH).</p>	<p><i>Marcadores</i>: igual que los osteoblastos y específicamente CD44 (ausente en osteoblastos, y células limitantes).</p>	

- B. Matriz orgánica (osteóide): formada por colágeno I (90%), y otras proteínas no colágenas: factores de crecimiento, proteoglicanos, glicoproteínas, proteínas procedentes del plasma o proteínas con ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico.
- C. Matriz ósea: matriz extracelular mineralizada que contiene cristales de hidroxiapatita en un 65% (fosfato cálcico cristalizado).

## 1.6.2 La regeneración ósea

### 1.6.2.1 Fases de la regeneración ósea(47)(Tabla 7)

**Tabla 7.** Fases de la regeneración ósea.

<i>Fases</i>	<i>Procesos que se ponen en marcha en cada fase</i>
<b><i>Formación del coágulo</i></b>	Tras un traumatismo, se liberan mediadores inflamatorios y se genera un coágulo compuesto por fibrina que tiene una función homeostática y, además, sus plaquetas liberan: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2; y factor de crecimiento insulínico (IGF-I). Los TGF y el IGF-I activan y favorecen la proliferación de células madre; y el PDGF activa a los macrófagos que liberarán otros factores de crecimiento. El tejido está hipóxico y acidótico en este momento crítico
<b><i>Proliferación y diferenciación celular</i></b>	Entre el 3º y 5º día se desarrolla un tejido de granulación formado por fibroblastos y macrófagos; colágeno y vasos sanguíneos de nueva formación. Invaden el coágulo aportando nutrientes y células indiferenciadas capaces de evolucionar a osteoblastos bajo la influencia de factores morfodiferenciadores como los BMP. A medida que las células se diferencian, se genera el “callo de fractura”. Se empieza a formar hueso desorganizado y poco estable durante 4 semanas. La acción de los factores BMP, TGF- $\beta$ , FGF, VEGF y PDGF llevarán a la reparación ósea entre la 6ª y 8ª semanas
<b><i>Remodelación ósea</i></b>	El hueso desorganizado pasa a ser una estructura estable, con sistema haversiano, por acción de factores como el IGF-I y las BMP; y de osteoblastos y osteoclastos. Aquí tienen lugar tres procesos: <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Osteogénesis</u>: formación de nuevo hueso.</li> <li>- <u>Osteoinducción</u>: estimulación de la osteogénesis por acción de determinados factores.</li> <li>- <u>Osteoconducción</u>: desarrollo de la matriz tridimensional que dará soporte al nuevo hueso.</li> </ul> <p>Por ello, los biomateriales que utilicemos deben cumplir alguna de estas cualidades.</p>

### 1.6.2.2 Estado actual de terapias e investigación en regeneración ósea

Las terapias se utilizan para tratar fracturas no consolidadas y que degeneran en pseudoartrosis. La intervención consiste colocar tornillos e injertos óseos que favorezcan la regeneración(48).

La tendencia es hacia el uso de células madre. Sin embargo, para que sea posible, hay que establecer protocolos estandarizados desde la obtención del material celular hasta establecer los criterios clínicos; y en esta dirección es hacia donde se dirigen muchas investigaciones. Actualmente se están llevando a cabo ensayos con MSC de origen medular y adiposo, pero también con DPSC, sobre materiales biocompatibles en busca del “gold estándar”.

Tanto en humanos como en pequeños mamíferos, se cuenta con estudios más avanzados y con mejores resultados en cirugía reconstructiva maxilofacial y dental(37,38).

El fracaso en la regeneración espontánea de fracturas, llega en algunos casos hasta el 50%(20), un porcentaje que asegura que la investigación es rentable clínicamente.

## **2 JUSTIFICACIÓN**

En el mundo desarrollado hay un considerable aumento de la incidencia y prevalencia de patologías asociadas a la pérdida de masa ósea, localizada y generalizada.

Utilizamos injertos, siendo de referencia el autólogo (es osteogénico, osteoconductor, aporta células osteocompetentes y su matriz extracelular es rica en proteínas de señalización; y es osteoconductor) con una estructura idéntica a la del hueso.

No obstante, su uso presenta inconvenientes:

- Morbilidad en la zona donante.
- Biodisponibilidad.
- Cantidad limitada de células osteocompetentes viables.
- Prolongación en el tiempo de la intervención quirúrgica.

Si analizamos el mecanismo de acción de los injertos observamos que el proceso de regeneración requiere mayoritariamente células con capacidad osteogénica existentes en los tejidos del propio paciente, siendo los tratamientos, simples facilitadores de su función.

### **3 HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

#### **3.1 HIPÓTESIS**

La codiferenciación de las DPSC en células endoteliales y osteoblastos llevará a la formación de tejido óseo vascularizado en un defecto óseo crítico, en un modelo experimental, mediante un procedimiento sencillo, asequible y fácilmente reproducible.

#### **3.2 OBJETIVOS**

Encontrar un sustituto biológico ideal para la reparación de defectos óseos. En nuestro estudio experimental sugerimos que el potencial de regeneración ósea mediante DPSC, puede incrementarse al asociarlo con un *scaffold*, ya que aumenta la concentración de factores osteogénicos en el defecto.

Para ello, debemos:

- Describir y comparar histológicamente la regeneración con y sin DPSC, a los 3 y 6 meses.
- Describir e identificar el tipo de hueso que se regenera.

## **4 MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realiza un estudio randomizado ciego. Se asignan los animales de forma aleatoria a cada grupo, y se desconoce el grupo al que pertenece cada muestra con la que se trabaja, así como el producto administrado. Todo ello, hasta la determinación y valoración de los resultados estadísticamente.

### **4.1 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN**

Ratas adultas macho, WISTAR Han™ (RccHan™:WIST), de 350g, de Harlan Laboratories Models, S.L. Todos los experimentos fueron realizados acorde a las directrices establecidas por el RD53/013 (Evaluación Favorable del Comité de Ética de la Universidad de Salamanca, con número de registro 361).

### **4.2 MATERIAL BIOLÓGICO: OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS**

#### **4.2.1 Obtención del tejido pulpar**

Para la extracción de DPSC, utilizamos los molares de 4 ratas (n=2 pulpas por extracción). La extirpación se realizó bajo anestesia general Isovet®, Braun vetcare S.A. (isoflurano) y de forma aséptica.

Una vez obtenidas las piezas, se fracturaron con pinza gubia, y se accedió al material. Se obtuvo el tejido pulpar a través de una minicucharilla de legrado Hemingway® (Modelo 1145/0).

Las muestras se depositaron en un tubo falcon (50 ml) con 30 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco®, Invitrogen), que contiene 7 sales minerales, 14 aminoácidos, 9 vitaminas, 1gr/l de glucosa, 0,5 gr/l de L-glutamina, 0,0150 gr/l de rojo fenol y 0,11 gr/l de piruvato, suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml), y suero bovino fetal (SBF) al 10% (Invitrogen), y se conservó en frío, un máximo de 6 horas.

Una vez obtenidas las muestras, los animales se sacrificaron con una inyección intraperitoneal de ketamina (Ketolar®), causándoles sobredosis.

#### **4.2.2 Disgregación enzimática**

El tejido se incubó durante 70 minutos a 37°C y en agitación con colagenasa I (al 0,2%) (Worthington Biochemicals Corporation®) y dispasa II (al 0,4%) (Sanko Junyaku, Tokio, Japón). Se centrifugó durante 10 minutos a 1200rpm, y el sedimento obtenido se sembró en placas de 9 cm<sup>2</sup> y se incubó de nuevo a 37°C.

#### **4.2.3 Cultivo y expansión celular**

Las células se incubaron de nuevo a 37°C, en ambiente húmedo y con 5% de CO<sub>2</sub> en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium®), suplementado con SBF (10%) (Equitech-Bio, Kerrville, TX®) y con penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Se reemplazó el medio de cultivo dos veces por semana y se fueron descartando las células no adheridas.

El cultivo se mantuvo hasta que se consiguió una confluencia celular de, al menos, el 80-90%. Una vez alcanzado, se eliminó el medio de cultivo, se lavó con PBS estéril (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisely, UK®) y se incubó 5 minutos a 37°C con tripsina 1 (0,05%) (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisely, UK®).

La tripsina 1 se neutralizó y añadimos medio de cultivo para MSC. Para aumentar la celularidad, se sembraron de nuevo a una concentración de 5.000 células/cm<sup>2</sup> en matraces más grandes, hasta el pase 10 (P10).

Los resultados obtenidos mostraron que a partir del material y utilizando métodos de digestión enzimática es posible aislar células con las características esenciales de las DPSC; y morfología fibroblastoide, alargada y aplanada.

#### **4.2.4 Caracterización y diferenciación**

Se aislaron células para su caracterización inmunofenotípica e inducción a la diferenciación en varios pases (1, 3, 6 y 10) para comprobar su capacidad osteoblástica.

Se cultivaron en las mismas condiciones dos muestras paralelas (a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad >90%): una para diferenciación a osteoblastos y otra control.

El medio para diferenciación osteogénica (NH Osteodiff Médium, Miltenyi, Bistec, Germany) contenía  $\beta$ -glicerol fosfato, ácido ascórbico-2-fosfato, dexametasona y SBF. Los cultivos se mantuvieron 10 días y cada 3-4 se cambió el medio. A continuación, se lavaron con PBS y se fijaron durante 10 minutos con Merck KGaA, Darmstadt, Germany (etanol frío (70%)).

Para demostrar la diferenciación a osteoblastos, se observó la actividad fosfatasa alcalina gracias a la tinción durante 20-30 minutos con NBT/BCIP (Nitroblue tetrazolium chloride 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Roche, Basel, Switzerland); y se contrastó durante 2 minutos con hematoxilina (1 mL) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

### **4.3 MATRICES TRIDIMENSIONALES O SCAFFOLDS**

Utilizamos OsteoBiol® Gen-Os®, sustituto óseo de 250-1000 micras, en grano. Es de origen biológico (porcino) y está basado en hidroxapatita (HA) y colágeno tipo I. Su composición es un 80% hueso esponjoso y un 20% cortical.

### **4.4 MODELO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**

#### **4.4.1 Diseño experimental, animales y grupos**

En el diseño experimental se utilizaron 40 ratas macho adultas (n=40) distribuidas en grupos según la siguiente tabla(**Tabla 8**):

**Tabla 8.** Distribución de los animales.

<i>Grupo</i>	<i>Subgrupo</i>	<i>Defecto óseo</i>	<i>Membrana OsteoBiol® Evolution®</i>	<i>Sustituto óseo OsteoBiol® Gen-Os®</i>	<i>DPSC</i>	<i>Sacrificio</i>
<i>SHAM</i>	N=4	No	No	No	No	3 meses
<i>Grupo C</i>	A (n=6)	Sí	Sí	No	No	3 meses
	B (n=6)	Sí	Sí	No	No	6 meses
<i>Grupo G+M</i>	A (n=6)	Sí	Sí	Sí	No	3 meses
	B (n=6)	Sí	Sí	Sí	No	6 meses
<i>Grupo G+M+S</i>	A (n=6)	Sí	Sí	Sí	Sí	3 meses
	B (n=6)	Sí	Sí	Sí	Sí	6 meses

#### **4.4.2 Técnica anestésica**

Los animales fueron anestesiados con una inyección de 75 mg/kg de Ketolar® 50mg/mL Parke-Davis Grupo Pfizer (cloruro de ketamina); 50 mg/kg de Valium® 10mg/2mL Roche Farma S.A. (diazepam) y 20 mg/kg de B/BRAUN 1 mg (atropina) a nivel intraperitoneal.

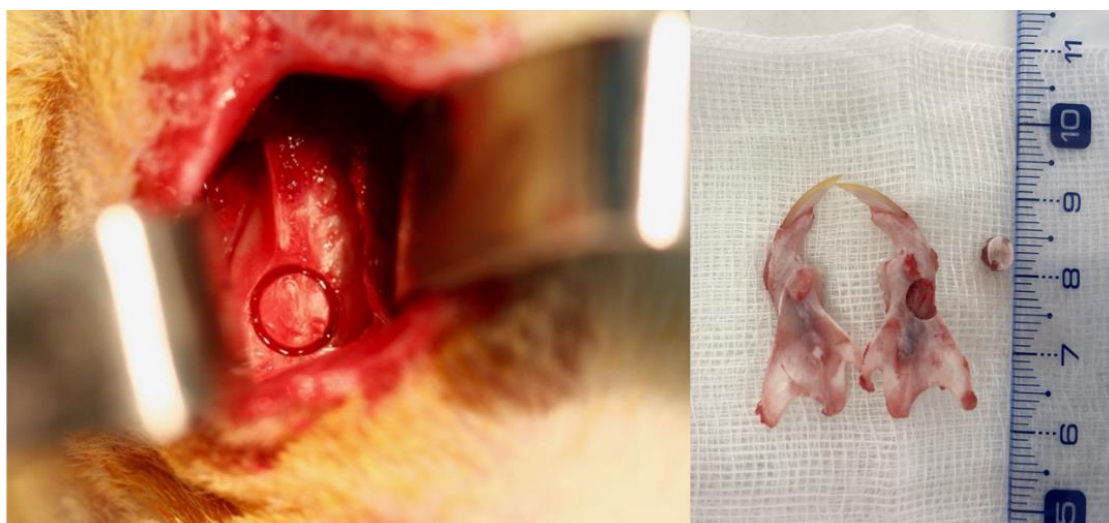
#### **4.4.3 Técnica quirúrgica**

La intervención quirúrgica tuvo lugar sobre tablas calefactadas de microcirugía, para evitar la pérdida de calor. El animal de experimentación se colocó en decúbito supino y se sujetaron las extremidades, exponiendo por completo el campo quirúrgico.

Se utilizó, en todo momento, instrumental estéril y campana de flujo laminar; y se respetaron estrictas condiciones de asepsia. El campo quirúrgico se preparó rasurando la piel del animal y administrando Betadine, Asta Medica® (solución antiséptica de povidona yodada).

El abordaje que se realizó fue submandibular, y se accedió al ángulo y a la rama ascendente de la mandíbula derecha. Se realizó un defecto óseo circular de 4,8 mm de diámetro (tamaño crítico).

Las osteotomías se realizaron con irrigación de suero fisiológico continuada y utilizando un micromotor eléctrico, con fresa trefina de 4,8 mm(**Figura 1**).



**Figura 1.** Acceso a la cresta de inserción. Osteotomía circular con fresa trefina.

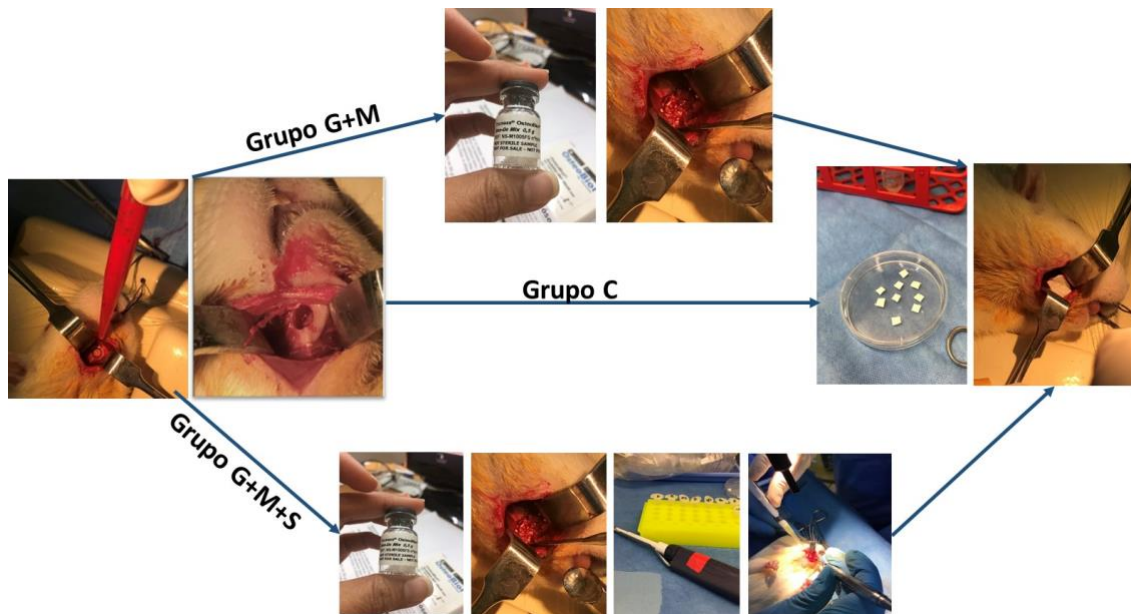
Las heridas se suturaron por planos (con sutura reabsorbible para el plano muscular y no reabsorbible en la piel).

Los materiales utilizados por grupos se resumen en la **Tabla 9**:

**Tabla 9.** Distribución de materiales empleados en cada uno de los grupos.

	<i>Grupo C</i>	<i>Grupo G+M</i>	<i>Grupo G+M+S</i>
<b><i>Relleno del defecto</i></b>	Ninguno	Relleno con OsteoBiol® Gen-Gen-Os® (sustituto óseo en grano de 250-1000 micras.	Relleno con OsteoBiol® Gen-Gen-Os® (sustituto óseo en grano de 250-1000 micras.
<b><i>Biomateriales utilizados para cubrir el defecto</i></b>	Membrana OsteoBiol® Evolution® de 5 mm de lado. Modelada con tijeras estériles; posteriormente fue hidratada con solución fisiológica tibia, estéril.	Membrana OsteoBiol® Evolution® de 5 mm de lado. Modelada con tijeras estériles; posteriormente fue hidratada con solución fisiológica tibia, estéril.	Membrana OsteoBiol® Evolution® de 5 mm de lado. Modelada con tijeras estériles; posteriormente fue hidratada con solución fisiológica tibia, estéril.
<b><i>Material biológico</i></b>	No	No	DPSC obtenidas a partir de molares de rata.

Estos procedimientos se resumen en la **Figura 2**:



**Figura 2.** Procedimientos en los tres grupos: Grupo C, Grupo G+M, Grupo G+M+S.

Se realizó un seguimiento clínico postquirúrgico de los animales, en el que se analizó su estado general, la apariencia de la herida y la zona intervenida, la presencia de exudado o sangrado; y el rechazo de los biomateriales o membranas empleados, así como posibles cambios degenerativos por lesión del diente.

Al finalizar la experimentación (a los 3 y 6 meses), los animales fueron sacrificados y se obtuvieron las muestras: se extrajo sangre total por punción aórtica, se extirparon las hemimandíbulas (en bloque) y se procedió a la recogida de tejido(**Figura 3**).



**Figura 3.** Hemimandíbulas recién extirpadas: se observa el defecto realizado con la trefina.

En las piezas se identifican las zonas donde se provocaron las lesiones.

- El tejido se introdujo en nitrógeno líquido y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  (en tubos de criocongelación).
- Las hemimandíbulas se sumergieron en formaldehído 3,7-4,0% p/v tamponado a  $\text{pH}=7$ .
- Y las muestras sanguíneas, obtenidas por punción aórtica, se centrifugaron 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , a 4500 rpm. Se extrajo el suero y tras dividir las de forma proporcional, fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4.4 Comprobación de la viabilidad celular**

Como las DPSC son transportadas de un laboratorio a otro, comprobamos que las células implantadas son viables. Para ello, conservamos un volumen pequeño de células implantadas, se traslada de nuevo al laboratorio y se vuelven a sembrar. Si hay células vivas, proliferarán y se adherirán a la placa.

#### **4.4.5 Estudio radiológico**

Antes del sacrificio, dos animales de cada grupo, fueron sometidos a valoración radiológica por tomografía (CT) a los 3 y 6 meses.

Se llevó a cabo un estudio densitométrico sobre la zona del defecto óseo para valorar su evolución.

Las imágenes obtenidas por radiología se transfirieron al ordenador y fueron digitalizadas según niveles de grises (16 bits). El programa utilizado fue FIJI, de código abierto, “paquete de procesamiento de imágenes” (“distribución de IMAGE-J con complementos añadidos para el análisis de imágenes”) en su versión para Windows.

#### 4.4.6 Estudio histológico

##### 4.4.6.1 Procesado de la muestra

###### A. Material (Tabla 10):

**Tabla 10.** Material para el procesado de las muestras.

<i>Ácido nítrico</i>
<i>Agua destilada</i>
<i>Etanol absoluto</i>
<i>Xilol</i>
<i>Parafina</i>
<i>Micrótopo de rotación (Micron HM 350 S. Thermo Scientific. Germany)</i>
<i>Portaobjetos</i>
<i>Cubreobjetos</i>

###### B. Preparación de las soluciones:

Solución de Ácido Nítrico al 5 %. Se toman 5 ml de ácido nítrico y se diluyen en 95 ml agua destilada.

Soluciones de etanol al 50%, 70%, 80% y 95%. Se toman 50, 70, 80 y 95 ml de etanol absoluto y se mezclan con 50, 30, 20 y 5 ml, respectivamente, de agua destilada.

###### C. Procedimiento (Tabla 11):

**Tabla 11.** Procedimiento de preparación de las muestras para su estudio histológico.

<b><i>Decalcificación del hueso</i></b>	Se introduce la muestra en solución de ácido nítrico al 5%, en una relación volumétrica de 1/20 como mínimo, a 25°C durante 24 horas. Después se aclara el ácido con en agua destilada.
<b><i>Deshidratación de la muestra</i></b>	Se elimina el agua de la muestra mediante inmersión en soluciones de etanol de concentraciones crecientes, 50%, 70%, 80%, 95% y absoluto. La muestra se tendrá una hora en cada solución a fin de que la deshidratación se produzca de lentamente, evitando deformidades.
<b><i>Aclaramiento o diafanización</i></b>	Después se procede a la sustitución del etanol mediante inmersión en una sustancia miscible tanto en el etanol como en la parafina, se emplea el xilol o xileno. Se mantendrá el baño una hora a temperatura ambiente.

<b><i>Inclusión y formación de bloques en parafina</i></b>	La muestra se introduce en parafina fundida a 60°C, se coloca la muestra en la estufa a 60°C hasta un máximo de 6 horas, en dependencia del grosor de la muestra. Luego se coloca la muestra, orientándola, en un molde con parafina fundida y se deja solidificar a temperatura ambiente para formar el bloque.
<b><i>Obtención de los cortes</i></b>	Se obtienen cortes de entre 4 y 6 micras con microtomo, se mantienen en un baño termostatzado con agua tibia, los cortes se extienden con cuidado, para evitar que se formen arrugas y se recogen con un portaobjetos desengrasado cubierto por una capa de adhesivo de Mayer.
<b><i>Tinción de los cortes</i></b>	Se desparafinan los cortes con xilol a 58°C durante 15'. Después se rehidratan en solución alcohólica de concentración decreciente, comenzando por etanol absoluto seguido del de 95%, 80%, 70% y 50%, durante 30'', seguidamente se aclarara 30'' en agua destilada y se procede a la tinción con hematoxilina y eosina.
<b><i>Preparación final</i></b>	Se deshidrata con alcoholes de gradación creciente, se aclara con xilol y se pega un cubreobjetos con una gota de adhesivo bálsamo de Canadá, con un índice de refracción similar al del vidrio.

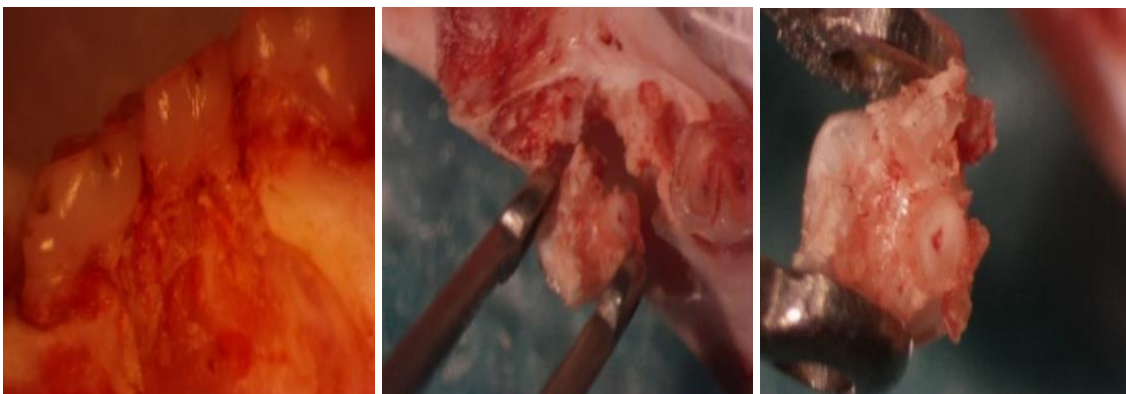
#### D. Estudio histológico comparativo:

Se observan las muestras al microscopio óptico.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL (DPSC)

Las DPSC se obtuvieron con éxito a partir de la cámara pulpar de los molares de 4 ratas (n=2 pulpas por extracción)(Figura 4).



**Figura 4.** Extracción de las pulpas.

### **5.1.1 Estudio de la proliferación celular**

Tras la disgregación enzimática del material, las DPSC se sembraron hasta confluír (aproximadamente 10 días). A las 2 horas de obtener las células, la densidad era baja; a las 24 horas empiezan a contactar y proliferar; y a la semana alcanzan un 70% de confluencia. En 10 días se consigue el 100% de confluencia, momento en el que se obtiene la línea celular (pase 1).

Se analizó la actividad fosfatasa alcalina en diferentes pases (1, 3, 6 y 10) para comprobar la diferenciación osteoblástica y se realizaron sucesivos cultivos para obtener más células.

## **5.2 RESULTADOS IN VIVO EN EL MODELO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**

### **5.2.1 Cirugía**

Se intervinieron 40 animales, provocando 36 lesiones mandibulares. Ningún animal murió en el postoperatorio, ni sufrió fracturas. En todos los grupos, el estado general de los animales ha sido favorable, salvo una ligera tumefacción de partes blandas por la osteotomía, resuelta espontáneamente. Se obtuvieron 36 lesiones aptas para estudio, siendo su distribución la de la [Tabla 8](#).

### **5.2.2 Comprobación de la viabilidad celular en los implantes**

Tras la cirugía, los restos de los viales se sembraron en placas. En unos días aparecieron células pegadas a la placa, por tanto, células viables y proliferando.

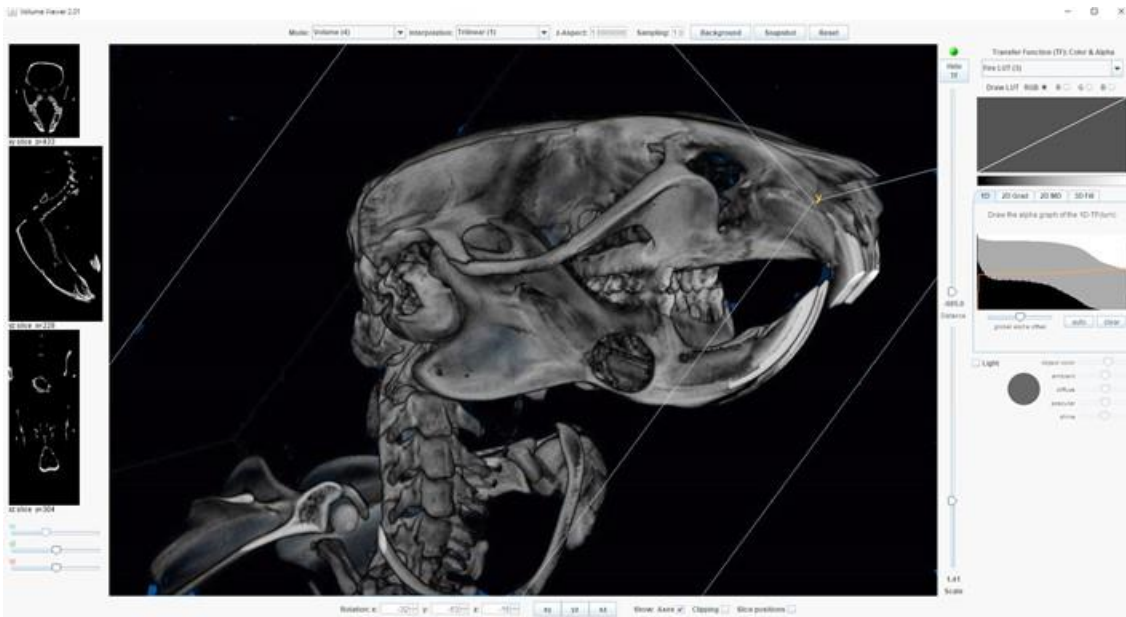
### **5.2.3 Análisis radiológico**

Todas las imágenes tomadas fueron aptas para el estudio. En este trabajo solo mostraremos la imagen radiológica de un defecto del grupo C a los 3 y 6 meses para valorar la curación a distintos tiempos. El área de estudio se define como un círculo de 4,8 mm de diámetro. Los resultados se recogen en la **Tabla 12**:

**Tabla 12.** Evidencias radiológicas en el Grupo C a los 3 y 6 meses.

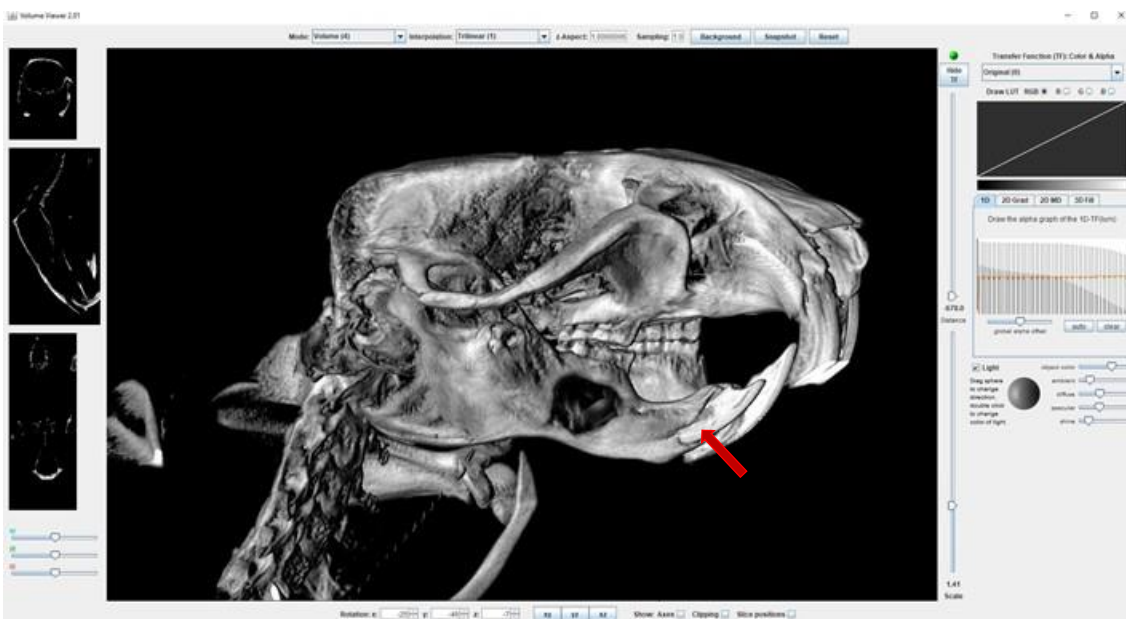
	<i>3 meses</i>	<i>6 meses</i>
<b>Grupo C</b> <i>(sin tratamiento)</i>	No se evidencian signos de curación.	No se evidencian signos de curación. Transformación degenerativa dentaria.

No se aprecian cambios a los 3 meses(**Figura 5**):



**Figura 5.** Imagen radiológica de un defecto del grupo C a los 3 meses.

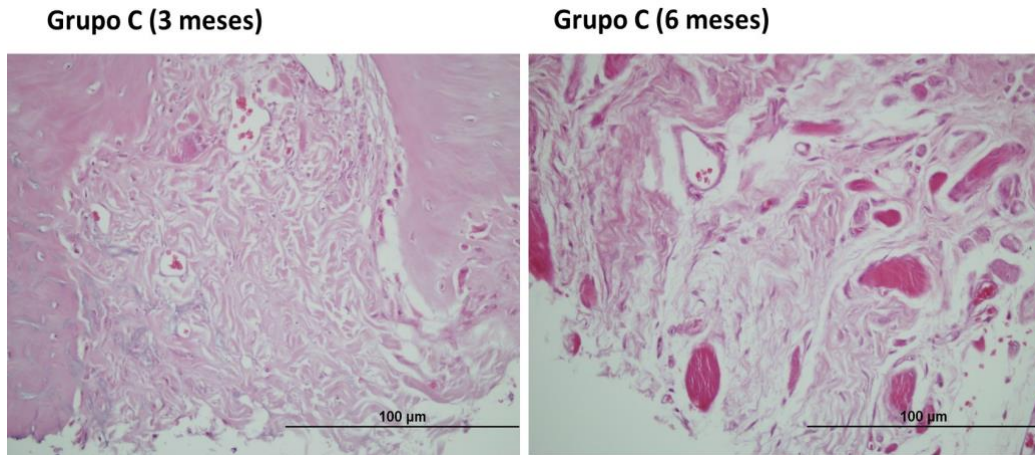
Visualizamos los cambios a los 6 meses(**Figura 6**):



**Figura 6.** Imagen radiológica de un defecto del grupo C a los 6 meses. Flecha roja: transformación degenerativa dentaria.

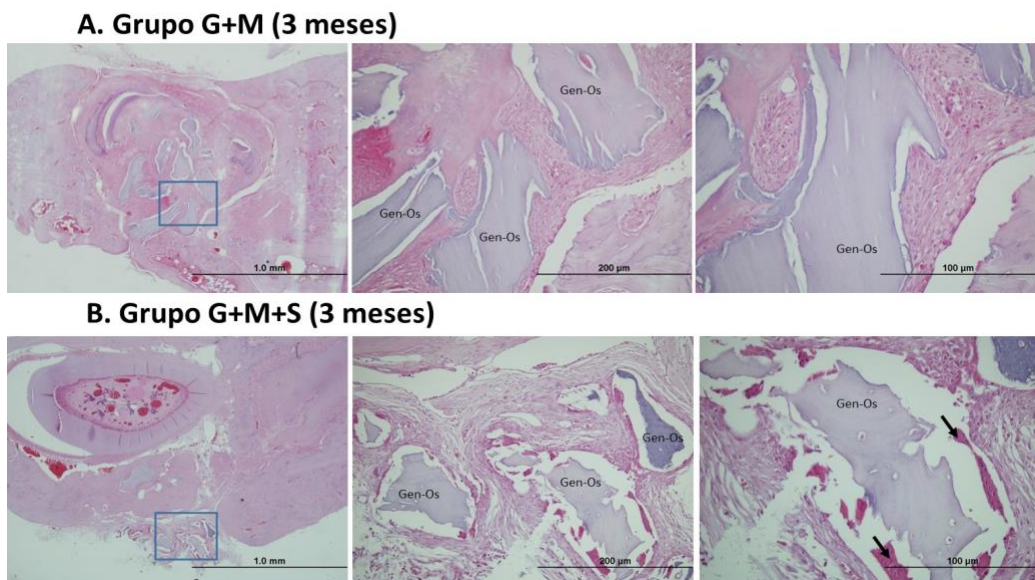
## 5.2.4 Estudio histológico

A continuación, las imágenes histológicas del grupo C(**Figura 7**):



**Figura 7.** Reacción fibrosa de una lesión sin tratamiento.

En las siguientes imágenes apreciamos los cambios en los grupos G+M; y G+M+S a los 3 meses(**Figura 8**):



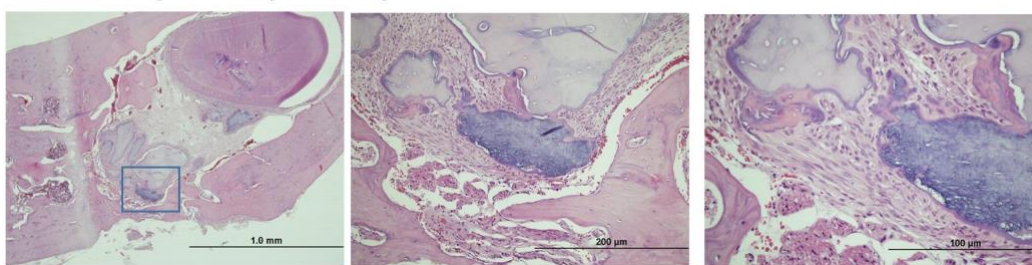
**Figura 8.** Hematoxilina/eosina del defecto óseo a los tres meses.

**A) Grupo G+M.** Inflamación crónica.

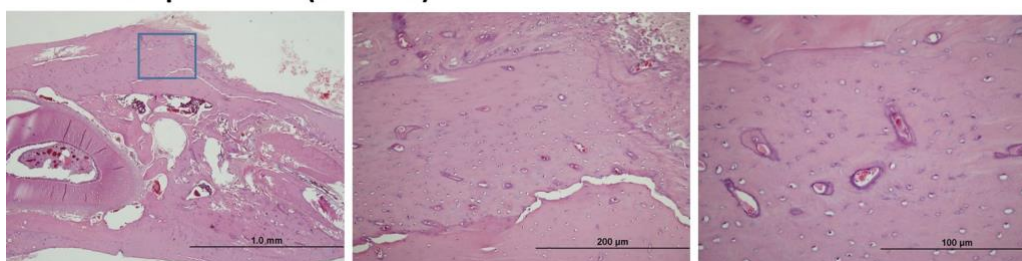
**B) Grupo G+M+S.** Osteogénesis. Flechas negras: osteoblastos incluidos en el osteoide.

Por último, los cambios histológicos de los grupos G+M; y G+M+S a los 6 meses(**Figura 9**):

**A. Grupo G+M (6 meses)**



**B. Grupo G+M+S (6 meses)**



**Figura 9.** Hematoxilina/eosina del defecto óseo a los seis meses.

**A) Grupo G+M.** Inflamación crónica.

**B) Grupo G+M+S.** Osteogénesis.

Los resultados se resumen en la **Tabla 13**:

**Tabla 13.** Resultados del estudio histológico en los diferentes grupos.

	<b>Grupo C</b>	<b>Grupo G+M</b>	<b>Grupo G+M+S</b>
<b>Tratamiento</b>	No. Defecto vacío, cubierto con membrana OsteoBiol® Evolution®.	Sí. Defecto relleno con OsteoBiol® Gen-Os® (sustituto óseo en grano) y cubierto con membrana OsteoBiol® Evolution®.	Sí. Defecto relleno con OsteoBiol® Gen-Os® (sustituto óseo en grano) y DPSCs (material biológico). Cubierto con membrana OsteoBiol® Evolution®.
<b>Resultados a los 3 meses</b>	Reacción fibrosa. No hay signos de regeneración ósea ( <b>Figura 7</b> ).	Distinguimos los bordes de la lesión. Se observan partículas de biomaterial y componente inflamatorio crónico. Sin signos de regeneración ( <b>Figura 8A</b> ).	Gran celularidad. Se evidencian osteoblastos activos y, en algunas zonas, trabéculas óseas neoformadas rodeando al biomaterial. En las líneas de osificación se aprecian osteocitos y zonas con células precursoras osteoblásticas y osteoblastos parcialmente incluidos en el osteoide, al que van calcificando. Existe osteoclastogénesis sobre el biomaterial. Hay gran actividad osteoformadora ( <b>Figura 8B</b> ).

<b>Resultados a los 6 meses</b>	Reacción fibrosa que desborda los márgenes del defecto. Sin signos de regeneración ósea <b>(Figura 7)</b> .	Seguimos observando partículas de biomaterial que están encapsuladas en una matriz fibrótica. No hay señales de formación de hueso y hay componente inflamatorio crónico. No presenta signos de regeneración <b>(Figura 9A)</b> .	Observamos regeneración ósea completa en la zona tratada con DPSC, con un hueso bien organizado, bien vascularizado y con una estructura lamelar rodeada de canales haversianos <b>(Figura 9B)</b> .
---------------------------------	---	---	--

## 6 DISCUSIÓN

En la actualidad, está aumentando la patología asociada a la pérdida de masa ósea y las fracturas por fragilidad(18,19). Además, un porcentaje importante de ellas (entre el 5 y el 50%) no evoluciona favorablemente de forma espontánea y requiere tratamiento quirúrgico(20).

Conocemos ya las ventajas e inconvenientes de los diferentes injertos; y se ha justificado que su futuro terapéutico pasaría por el empleo de materiales aloplásticos biocompatibles que supongan los mínimos inconvenientes y los máximos beneficios para el paciente. Al mismo tiempo, el uso combinado de las MSC, cada vez más accesibles, y estos materiales podría favorecer la regeneración tisular y aceleraría los procesos.

La ingeniería del tejido óseo requiere la combinación de factores osteoinductivos, células osteoprogenitoras, una matriz que de soporte y un adecuado aporte sanguíneo(49). Es aquí donde hemos observado que las DMSC juegan un papel fundamental.

Con este estudio experimental hemos querido evaluar ese nivel de implicación de cada uno de estos materiales en la regeneración de un defecto mandibular crítico en rata. Se han analizado resultados obtenidos con dos tipos de biomateriales: membrana OsteoBiol® Evolution® (basada en fibras colágenas densas) y OsteoBiol® Gen-Os® (sustituto óseo de elevada osteoconductividad); y en qué medida el proceso se ve favorecido por el uso de DPSC sobre el *scaffold*.

Los modelos animales son un paso esencial en el ensayo de nuevos materiales regenerativos y, en ellos, el defecto óseo experimental debe ser lo suficientemente grande para evitar la regeneración espontánea. Para lograr ese umbral de no regeneración se ha investigado en varios ensayos con animales. Los modelos animales basados en lesiones de tamaño crítico son válidos para estudiar defectos óseos en diferentes localizaciones como el cráneo o la mandíbula. Un defecto crítico se define como el que regenerará menos del 10% de hueso durante la vida del animal(50) y en la mandíbula de rata será un área de más de 4 mm de diámetro(51). Se han descrito modelos experimentales basados en mandíbula de rata para la regeneración ósea, porque los defectos ocasionados no mostraron regeneración espontánea y, por tanto, son válidos para estudiar materiales de formación ósea y sustitutos(52,53). De esta forma, el modelo experimental utilizado en nuestro estudio es óptimo para investigar la eficacia de las DPSC en la osteogénesis. Además, consideramos que es reproducible, tiene un alto rendimiento y es económico.

Hemos observado que el acceso a la pulpa dental es fácil y la extracción de DPSC es altamente eficiente. En el año 2003, las DPSC se caracterizaron por medio de marcadores específicos de MSC(54), observando su capacidad de autorregeneración, diferenciación a múltiples linajes y su capacidad clonogénica; hallando DPSC capaces de formar dentina asociada con tejido pulpar *in vivo*. Otro estudio confirma la diferenciación de DPSC en odontoblastos al ser estimuladas por proteínas morfogenéticas óseas(55), y también ha sido demostrado su co-diferenciación en osteoblastos y endotelios(56). Además, las DPSC pueden sobrevivir largos periodos, sin observarse signos de senectud(57,58). Por lo tanto, son células ideales para el estudio por su gran capacidad de diferenciación y su interacción con biomateriales.

Se evaluaron 4 grupos: un grupo control, otro con el defecto sin tratar y dos bajo tratamiento y se realizaron 40 intervenciones quirúrgicas, obteniendo un defecto mandibular apto para el estudio en 36 de las ratas. El resto pertenecía al grupo control (n=4). Ninguna de las intervenciones presentó complicaciones.

En la siguiente tabla quedan resumidos la distribución de grupos y materiales; y los resultados extraídos(**Tabla 14**):

**Tabla 14.** Resumen de materiales y resultados por grupos.

		<b>Grupo C</b>	<b>Grupo G+M</b>	<b>Grupo G+M+S</b>
<b>Tratamiento</b>		No	OsteoBiol® Gen-Os®.	OsteoBiol® Gen-Os® y DPSC.
<b>Cambios histológicos</b>	<b>3 meses</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción fibrosa.</li> <li>• Sin regeneración.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se distinguen los bordes de la lesión.</li> <li>• Se observan partículas del biomaterial.</li> <li>• Componente inflamatorio crónico.</li> <li>• Sin regeneración</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gran celularidad.</li> <li>• Osteoblastos activos.</li> <li>• Nuevas trabéculas óseas rodeando al biomaterial.</li> <li>• Osteocitos en líneas de osificación.</li> <li>• Células precursoras osteoblásticas en algunas zonas.</li> <li>• Osteoblastos parcialmente incluidos en el osteoide, al que van calcificando.</li> <li>• Osteoclastogénesis sobre el biomaterial.</li> </ul>
	<b>6 meses</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción fibrosa.</li> <li>• Sin regeneración.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Partículas de biomaterial en una matriz fibrótica (encapsuladas).</li> <li>• Componente inflamatorio crónico.</li> <li>• Sin regeneración.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regeneración completa del hueso.</li> <li>• Hueso organizado y bien vascularizado.</li> <li>• Estructura haversiana.</li> </ul>
<b>Cambios radiológicos</b>	<b>3 meses</b>	No hay signos de curación.	No hay datos radiológicos por ausencia de tejido.	No hay datos radiológicos por ausencia de tejido.
	<b>6 meses</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No hay signos de curación.</li> <li>• Transformación degenerativa dentaria</li> </ul>	No hay datos radiológicos por ausencia de tejido.	No hay datos radiológicos por ausencia de tejido.

En el grupo C sólo cubrimos con OsteoBiol® Revolution®. Histológicamente, se advierte una formación fibrótica (coágulo) como consecuencia de la liberación de mediadores inflamatorios tras el defecto provocado, sin apreciarse signos de regeneración en ningún momento([Figura 7](#)). Las mandíbulas de dos animales de este grupo también se analizaron con pruebas radiológicas en las que no se observan signos de curación a los 3 meses. Como consecuencia de la hipoxia continuada en los osteocitos que bordean la lesión (no llegan capilares), mueren y se necrosan, produciendo una degeneración dentaria que se aprecia muy bien en la [Figura 6](#).

Los defectos mandibulares de los animales de los grupos G+M y G+M+S sí han sido tratados ([Figura 8](#) y [Figura 9](#)). El primero únicamente con OsteoBiol® Gen-Os®; y el segundo con sustituto óseo y DPSC. Histológicamente, las diferencias son muy evidentes. En el grupo G+M distinguimos, a los 3 meses, material necrótico (acelular) que se corresponde con el borde hipóxico de la lesión, mientras que en el grupo G+M+S ya hay alta celularidad. A este tiempo, también se aprecian, en ambos grupos, partículas de biomaterial, que en el caso del grupo G+M+S empiezan a ser rodeadas por trabéculas de matriz osteoide donde se incluyen algunos osteoblastos (que la empiezan a calcificar). El grupo G+M presenta abundante componente inflamatorio crónico rodeando el biomaterial. En este grupo, además, no se detecta actividad osteogénica ni a los 3, ni a los 6 meses. Por otra parte, en el grupo G+M+S se objetivan, ya desde los 3 meses, células precursoras de osteoblastos, osteocitos maduros en las líneas de osificación y actividad osteoclástica que reabsorbe el biomaterial. A los 6 meses, tenemos una estructura ósea organizada, hay regeneración completa y estructura haversiana bien vascularizada. Obtenemos hueso adulto, que mantiene las dimensiones originales. El nivel de actividad osteogénica en el grupo G+M+S estaría, por tanto, vinculado directamente a la acción de las DPSC, la única variable que difiere del grupo G+M que a los 6 meses no había iniciado siquiera la regeneración. Como ya adelantábamos, se confirma que en los defectos críticos no hay evidencia de actividad osteogénica sin tratamiento quirúrgico y terapia celular, de tal modo que se confirma que en estas condiciones es necesario contar con material celular suficiente y con alta capacidad osteogénica.

La co-diferenciación de las DPSC en osteoblastos y endotelocitos es la que consigue la integración completa de los vasos sanguíneos dentro de las líneas de osificación, llevando a la formación de tejido óseo vascularizado(56). Un ensayo clínico de 2019(59) demuestra que estas células producen vesículas extracelulares (VE) que contienen pro-angiogénicos (factores como VEGF, angiopoyetina o angiogenina). Por otro lado, el propio biomaterial OsteoBiol® Gen-Os® también tiene un potencial angiogénico mayor que otros materiales sintéticos, al favorecer la secreción de VEGF(60). Estas propiedades hacen que no sea necesario recurrir a otros factores exógenos de crecimiento vascular(60).

Parece demostrado, por tanto, que las DPSC son el elemento principal del proceso osteogénico que, además, completan en un período de tiempo de 6 meses. Las matrices aloplásticas quedarían en un segundo plano como mero facilitador de las funciones

celulares, aunque es básico que utilicemos las más adecuadas, porque servirá de soporte celular y facilitará la regeneración con factores osteoinductivos. Cada sustituto óseo posee unas propiedades diferentes y OsteoBiol® Gen-Os® parece ofrecer las mejores garantías para la osteogénesis. De hecho, un ensayo reciente(61) demuestra que la proliferación y reclutamiento de MSC es mayor con Gen-Os®, que con otros aloplásticos como Bio-Oss®. También, OsteoBiol® Gen-Os®, de origen biológico, provoca menos reacción inflamatoria que otros biomateriales sintéticos como Bonelike®(62). De hecho, en nuestras muestras con Gen-Os®, apenas apreciamos células inflamatorias.

Parece correcto afirmar que las propiedades de los diferentes elementos empleados en la regeneración de defectos óseos, favorecerían una correcta osteogénesis utilizados conjuntamente. Actuarían como un sustituto óseo ideal, permitiendo que el hueso se regenere manteniendo todas sus características.

## **7 CONCLUSIONES**

Nuestro estudio experimental demuestra que la combinación de DPSC con OsteoBiol® Gen-Os®, como sustituto óseo y la membrana OsteoBiol® Revolution®, completa con éxito la regeneración ósea de defectos críticos mandibulares en rata, sin presentar complicaciones. Esta conclusión se apoya en la gran capacidad osteogénica y angiogénica de las DPSC y la alta concentración de factores osteoinductivos que contiene el biomaterial. Podría establecerse como la combinación ideal en el tratamiento de defectos óseos, pero se debe continuar investigando en mecanismos de acción, dosis terapéuticas y otras posibles variables que puedan alterar los resultados.

Si los estudios con animales continúan siendo favorables, debemos dar el siguiente paso y verificar en investigaciones en humanos si los resultados extraídos del modelo animal son reproducibles y seguros. Aunque los datos obtenidos hasta ahora son prometedores, nuestras futuras investigaciones revelarán si se pueden trasladar a seres humanos.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. Atala A. Ingeniería de tejidos. In: Harrison principios de medicina interna [Internet]. 19th ed. McGrawHill Education; 2015. p. 92e1–3. Available from: [www.mhhe.com/harrison19](http://www.mhhe.com/harrison19)
2. Kessler JA. Aplicaciones de la biología de células madre en la medicina clínica. In: Harrison Principios de Medicina Interna [Internet]. 19th ed. McGrawHill Education; 2015. p. 90e1–3. Available from: [www.mhhe.com/harrison19](http://www.mhhe.com/harrison19)
3. Kasper LH, Peter F, Gordon F, Nutman TB, Adel A, Child JS, et al. Harrison. Principios de Medicina Interna. 19th ed. Vol. 1. McGrawHill Education; 2015. 453–456 p.
4. Roldán Vasco S, Vargas Isaza CA, Mejía Suaza ML, Zapata Giraldo J, Moncada Acevedo ME. Ingeniería de tejidos y aplicaciones. 2016.
5. Nikolova MP, Chavali MS. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioact Mater*. 2019;4(October):271–92.
6. Srouji S, Kizhner T, Livne E. 3D scaffolds for bone marrow stem cell support in bone repair. *Regen Med*. 2006;1(4):519–28.
7. Pangborn CA, Athanasiou KA. Growth factors and fibrochondrocytes in scaffolds. *J Orthop Res*. 2005;23(5):1184–90.
8. Barbeito CG, Laube PA. Los factores de crecimiento. Aspectos básicos y potencialidades perapéuticas. *Analecta Veterinaria*. 2005;25(1):8–27.
9. D’Oronzo S, Stucci S, Tucci M, Silvestris F. Cancer treatment-induced bone loss (CTIBL): Pathogenesis and clinical implications. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(9):798–808.
10. Robinson L, Micali N, Misra M. Eating disorders and bone metabolism in women. *Curr Opin Pediatr*. 2017;29(4):488–96.
11. Vestergaard P. Drugs Causing Bone Loss. *Handb Exp Pharmacol*. 2019;(December).
12. Kinon BJ, Liu-Seifert H, Stauffer VL, Jacob J. Bone loss associated with hyperprolactinemia in patients with schizophrenia: Are there gender differences? *Clin Schizophr Relat Psychoses*. 2013;7(3):115–23.

13. Osipov B, Emami AJ, Christiansen BA. Systemic Bone Loss After Fracture. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2018;16(4):116–30.
14. Engdahl C, Bang H, Dietel K, Lang SC, Harre U, Schett G. Periarticular Bone Loss in Arthritis Is Induced by Autoantibodies Against Citrullinated Vimentin. *J Bone Miner Res.* 2017;32(8):1681–91.
15. Powell CB, Alabaster A, Stoller N, Armstrong MA, Salyer C, Hamilton I, et al. Bone loss in women with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Gynecol Oncol.* 2018;148(3):535–9.
16. Ruchlemer R, Amit-Kohn M, Tvito A, Sindelovsky I, Zimran A, Raveh-Brawer D. Bone loss and hematological malignancies in adults: a pilot study. *Support Care Cancer.* 2018;26(9):3013–20.
17. Aguado E, Mabillean G, Goyenvalle E, Chappard D. Hypodynamia Alters Bone Quality and Trabecular Microarchitecture. *Calcif Tissue Int.* 2017;100(4):332–40.
18. Lim Y, Jo K, Ha HS, Yim HW, Yoon KH, Lee WC, et al. The prevalence of osteoporosis and the rate of bone loss in Korean adults: the Chungju metabolic disease cohort (CMC) study. *Osteoporos Int.* 2017;28(4):1453–9.
19. International osteoporosis Foundation. Huesos rotos, vidas: guía para mejorar la atención a las fracturas por fragilidad en España [Internet]. 2017 [cited 2020 Apr 19]. Available from: [http://share.iofbonehealth.org/EU-6-Material/Reports/IOF\\_Report\\_SPAIN\\_DIGITAL\\_SP.pdf](http://share.iofbonehealth.org/EU-6-Material/Reports/IOF_Report_SPAIN_DIGITAL_SP.pdf)
20. Marolt Presen D, Traweger A, Gimona M, Redl H. Mesenchymal Stromal Cell-Based Bone Regeneration Therapies: From Cell Transplantation and Tissue Engineering to Therapeutic Secretomes and Extracellular Vesicles. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7(November):1–20.
21. Anitua E, Troya M, Zalduendo M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. *Cytotherapy* [Internet]. 2018;20(4):479–98. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.12.011>
22. Villa García-Torres L., Flores-Hernández F., Santibáñez-Escobar L. Células madre de la pulpa dental (DPSC): prospectivas terapéuticas en enfermedades crónicas degenerativas. 2017;168–75.
23. Ranganathan K, Lakshminarayanan V. Stem cells of the dental pulp Embryology and Stem Cell Niche in the Dental Pulp Properties of Pulp Stem Cells Potential Applications of Stem Cells from the Pulp. 2015;(4):14–6.
24. Martínez Álvarez O, Barone A, Covani U, Fernández Ruíz A, Jiménez Guerra A,

- Monsalve Guil L, et al. Bone grafts and bone substitutes in implant dentistry. *Av Odontoestomatol*. 2018;34(3):111–9.
25. Azi ML, Aprato A, Santi I, Junior MK, Masse A, Joeris A. Autologous bone graft in the treatment of post-traumatic bone defects: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016;17(1):1–10.
  26. Shibuya N, Jupiter DC. Bone Graft Substitute: Allograft and Xenograft. *Clin Podiatr Med Surg*. 2015;32(1):21–34.
  27. Hallman M, Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol 2000*. 2008;47(1):172–92.
  28. Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. *Av en Periodoncia e Implantol Oral*. 2012;24(3):133–8.
  29. Mayer Y, Ginesin O, Khutaba A, Machtei EE, Zigdon Giladi H. Biocompatibility and osteoconductivity of PLCL coated and noncoated xenografts: An in vitro and preclinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018;20(3):294–9.
  30. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering, part III: allografts, bone grafting and bone banking in the twentieth century. *Int Orthop*. 2015;39(3):577–87.
  31. Herford AS, Miller M, Signorino F. Maxillofacial Defects and the Use of Growth Factors. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2017;29(1):75–88.
  32. Hao Z, Song Z, Huang J, Huang K, Panetta A, Gu Z, et al. The scaffold microenvironment for stem cell based bone tissue engineering. *Biomater Sci*. 2017;5(8):1382–92.
  33. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. *Biosci Rep*. 2015;35.
  34. Friedenstein A, Gorskaja J, Kulagina N. Fibroblast Precursors in Normal and Irradiated Mouse Hematopoietic Organs. *Exp Hematol*. 1976;Sep(4(5)):267–74.
  35. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42–60.
  36. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(6):747–54.
  37. Jahanbin A, Rashed R, Alamdari DH, Koohestanian N, Ezzati A, Kazemian M, et al. Success of Maxillary Alveolar Defect Repair in Rats Using Osteoblast-Differentiated Human Deciduous Dental Pulp Stem Cells. *J Oral Maxillofac Surg*

- [Internet]. 2016;74(4):829.e1-829.e9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2015.11.033>
38. Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F, et al. Three Years After Transplants in Human Mandibles, Histological and In-Line Holotomography Revealed That Stem Cells Regenerated a Compact Rather Than a Spongy Bone: Biological and Clinical Implications. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(4):316–24.
  39. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod.* 2010;36(11):1805–11.
  40. Stanley HR. The cells of the dental pulp. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1962;15(7):849–58.
  41. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966;16(3):381–90.
  42. Rosin A, Freiberg H, Zajicek G. The fate of rat bone marrow, spleen and periosteum cultivated in vivo in the diffusion chamber, with special reference to bone formation. *Exp Cell Res.* 1963;29(1–2):176–87.
  43. Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. A comparison of the in vitro mineralisation and dentinogenic potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Metab.* 2015;33(4):371–82.
  44. Bagú, L., Barbich M. Formación de tejido óseo a partir de células madre de pulpa dental. *Actual Osteol.* 2015;11(3):220–6.
  45. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I Alobera Gracia M, Del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir.* 2006;(11):E47-51.
  46. Megías M, Molist P, Pombal M. Tejidos animales. Atlas de histología vegetal y animal. [Internet]. 2019 [cited 2020 Apr 20]. Available from: [https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada\\_a\\_oseo.php](https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_oseo.php)
  47. Navarro Vila C. Reconstructive oral and maxillofacial surgery. *Reconstructive Oral and Maxillofacial Surgery.* 2015.
  48. Ruiz G, Moreno M, López M, Vega M. Medicina Regenerativa y Terapia Celular. Informe de Vigilancia Tecnológica. Madrid; 2008.
  49. Vacanti C. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2006;1(3):569–76.

50. Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. Vol. 1, *Journal of Craniofacial Surgery*. 1990. p. 60–8.
51. Kaban LB, Glowacki J, Murray JE. Repair of experimental mandibular bone defects in rats. *Surgical Forum*. 1979;30:519–521.
52. Das A, Fishero BA, Christophel JJ, Li CJ, Kohli N, Lin Y, et al. Poly(lactic-co-glycolide) polymer constructs cross-linked with human BMP-6 and VEGF protein significantly enhance rat mandible defect repair. *Cell Tissue Res*. 2016;364(1):125–35.
53. Liu H, Cui J, Feng W, Lv S, Du J, Sun J, et al. Local administration of calcitriol positively influences bone remodeling and maturation during restoration of mandibular bone defects in rats. *Mater Sci Eng C*. 2015;49:14–24.
54. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5807–12.
55. Liu L, Ling J, Wei X, Wu L, Xiao Y. Stem Cell Regulatory Gene Expression in Human Adult Dental Pulp and Periodontal Ligament Cells Undergoing Odontogenic/Osteogenic Differentiation. *J Endod*. 2009;35(10):1368–76.
56. D’aquino R, de Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, et al. Human dental pulp stem cells: From biology to clinical applications. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol*. 2009;312(5):408–15.
57. Laino G, D’Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: A useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*. 2005;20(8):1394–402.
58. Laino G, Graziano A, D’Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2006;206(3):693–701.
59. Merckx G, Hosseinkhani B, Kuypers S, Deville S, Irobi J, Nelissen I, et al. Angiogenic Effects of Human Dental Pulp and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells and their Extracellular Vesicles. *Cells*. 2020;9(2):312.
60. Rombouts C, Jeanneau C, Camilleri J, Laurent P, About I. Characterization and angiogenic potential of xenogeneic bone grafting materials: Role of periodontal ligament cells. *Dent Mater J*. 2016;35(6):900–7.
61. Jeanneau C, Le Fournis C, About I. Xenogeneic bone filling materials modulate mesenchymal stem cell recruitment: role of the Complement C5a. *Clin Oral*

Investig. 2019.

62. Figueiredo A, Coimbra P, Cabrita A, Guerra F, Figueiredo M. Comparison of a xenogeneic and an alloplastic material used in dental implants in terms of physico-chemical characteristics and in vivo inflammatory response. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2013;33(6):3506–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.047>