

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Influencia del tejido de origen sobre el potencial osteogénico de células madre mesenquimales en distintas superficies

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Arkaitz Mucientes Ruiz

DIRECTORES

Benjamín Fernández Gutiérrez
José Ramón Lamas López
Juan Ángel Jover Jover

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina



Tesis Doctoral

Influencia del tejido de origen
sobre el potencial osteogénico de
Células Madre Mesenquimales
en distintas superficies

Memoria para optar al grado de DOCTOR
presentada por

Arkaitz Mucientes Ruiz

Directores:

Dr. Benjamín Fernández Gutiérrez

Dr. José Ramón Lamas López

Dr. Juan Ángel Jover Jover

Madrid, 2020

Agradecimientos

*“Me parecía que la tierra no hubiera sido habitable
si no hubiese tenido a nadie a quien admirar.”*

Simone de Beauvoir

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Benjamín Fernández Gutiérrez que me diera la oportunidad de unirme a su grupo de investigación y realizar este trabajo bajo su supervisión. Igualmente estoy agradecido al Dr. José Ramón Lamas López y al Dr. Juan Ángel Jover Jover por aceptar unirse a este proyecto y apoyarme a lo largo del mismo. A lo largo de estos años he aprendido de cada uno de vosotros y, sin duda, mi crecimiento como científico e investigador habría sido imposible sin vosotros.

Después de tantísimas horas junto a Joserra, no sólo en el laboratorio, es imposible no impregnarse de su pasión y vocación por la investigación en su faceta más pura y clásica, que tiene como componente principal la curiosidad; como resumen, podría decir que en él veo personificada la cita de Isaac Asimov: *“La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es '¡Eureka!', sino 'Qué extraño'.”* Con Benjamín, además de compartir congresos en el extranjero y debates acerca del Athletic, he aprendido la importancia que tiene la traslacionalidad del trabajo que se realiza en un laboratorio de investigación básica al entorno clínico y a saber evidenciarla, contextualizando correctamente dicho trabajo. Juan Ángel ha sido clave en el inicio de mi interés por el *big data*, inteligencia artificial y las ITs al mostrarme su aplicabilidad y utilidad en el ambiente sanitario. Por encima de estas cualidades científicas, para mí destaca su faceta humana que quedó especialmente patente durante el tiempo que estuve “malito”, como dice Juan Ángel, y no dudaron en mostrar su preocupación, afecto y cariño hacia mi persona.

Eva Herranz es otra persona clave en la realización de esta tesis. Sin ella y su trabajo técnico habría sido imposible. De ella he aprendido las buenas prácticas que se han de realizar en el manejo de cultivos celulares, además de organizar el trabajo y logística que conlleva un laboratorio. Muchos cafés en el día a día compartidos con ella en los que se han gestado una amistad a base de compartir vivencias y anécdotas que me han permitido conocerla; en los momentos malos y/o frustrantes ha sido apoyo del mismo modo que en los buenos ha sido partícipe de la celebración. Sin duda, Eva es una de las alegrías inesperadas que me ha otorgado este trabajo.

También en mi aprendizaje del trabajo técnico del laboratorio han aportado su grano Sara, Sandra y Belén. Tampoco puede faltar en mis agradecimientos la Dra. María del Pilar Tornero que, junto con Joserra, me recibió en el laboratorio desde el primer día y me introdujo en la metodología de trabajo con las células madre mesenquimales.

Igualmente, quería mostrar mi agradecimiento a Luis, Lydia, Letty, Alfredo, Daly y Anuska (personal investigador del Servicio de Reumatología del Hospital Clínico San Carlos) por las múltiples dudas que me han ayudado con paciencia a aclarar y hacer del

día a día en el grupo de investigación una grata experiencia. No me puedo olvidar de Teresa, mi persona favorita para pincharme cada vez que me toca revisión, y Manoli por su buen y cariñoso trato cuando voy a las consultas a por agua; de las risas compartidas con Judit y Daly; de las conversaciones sobre películas con Pilar; de la siempre disposición a colaborar en la recogida de muestras de Pía y el interés por lo que ocurre en el laboratorio de Inés.

La logística y correcto funcionamiento del laboratorio es resultado, en gran medida, de la atención y la labor que realizan diariamente en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental Pablo, Cruz y Lola.

Las muestras biológicas usadas en este trabajo fueron obtenidas gracias al Dr. Luis Enrique Moro, del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Clínico San Carlos; a la Dra. María Jesús Peña del Servicio de Cirugía I del Hospital Clínico San Carlos; y a la Dra. Aranzazu González del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Clínico San Carlos. La Dra. Carmen Baudín y la Dra. Pilar Pena, del Instituto de Cerámica y Vidrio perteneciente al CSIC, cedieron los biomateriales empleados en este trabajo.

Aunque durante realización de la Tesis Doctoral he crecido como investigador, lo cierto es que mis primeros pasos en la investigación fueron en el laboratorio dirigido por el Dr. Javier Martín, del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” de Granada. Sin este pasado es seguro que no existiría este presente; por ello quería incluir en estos agradecimientos a las personas que más me influyeron durante mi estancia granadina: Javier Martín, Eguzkiñe Ochoa, Ana Márquez y David Carmona. De esta época no pueden faltar la mención a Paula y Borja.

A Jaume y Raimon los conocí en Oviedo hace casi una década. Desde entonces, esta amistad ha ido a más, han estado presentes en el camino que recorro, y no ha faltado a lo largo de esta tesis en forma de apoyo y preocupación. Para la tranquilidad de Raimon, diré que la musa finalmente me vino a visitar con suficiencia. La pluma de Jaume está presente en esta memoria en forma de correcciones de inglés.

Durante estos años, he tenido la suerte de poder conocer e incluir entre mis amistades a Pablo y Susana, de los cuales siempre he valorado especialmente su tesón y optimismo. Muchas experiencias conociendo Madrid, descubrimientos gastronómicos, escapadas, discusiones alrededor de cervezas, juegos de mesa, momentos duros y alegrías vividas junto a esta pareja han provocado que esta gran ciudad sea percibida por mí como más íntima y menos solitaria.

Nada de esto hubiese sido posible sin el gran esfuerzo que realiza a diario mi familia (Ama, Aita, Aitor, Kepa y María) por el que estaré siempre agradecido ya que me ha posibilitado realizar todos los estudios necesarios para enfocar mi vida a la investigación. Como vasco, es imposible no mencionar a la kuadrilla: siempre ha estado ahí y me ha hecho sentirme afortunado.

Por último, Mari Carmen. Por más veces que te lo haya dicho, lo vuelvo a repetir: eres la persona más especial, que más afortunado me hace sentir y a la que más admiro. No tengo duda alguna de que eres la mejor compañera de vida que pueda existir. Has estado a mi lado desde el comienzo de este proyecto, siempre haciéndome saber de tu apoyo y

confianza en mí. Has tenido una paciencia infinita con mis momentos de estrés y con mis inseguridades. Estuviste a mi lado en los meses más oscuros que me ha tocado vivir, siendo refugio en la tempestad, y no hay palabras suficientes para reflejar lo que significó. Estoy seguro de que sin ti, no habría sido capaz de culminar este trabajo.

Aunque vuestros nombres no aparecen en la autoría, esta Tesis Doctoral es también de todos vosotros.

A todos, gracias.

*“Las ideas no duran mucho.
Hay que hacer algo con ellas”*
Ramón y Cajal

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE.....	10
ABREVIATURAS.....	15
RESUMEN	18
ABSTRACT	21
INTRODUCCIÓN	24
Visión histórica de la Medicina Regenerativa	26
Estrategias para la regeneración del tejido óseo	30
Tejido Óseo.....	32
Estructura	32
Composición del hueso	34
Clasificaciones de los huesos.....	40
Biomateriales	43
Metálicos.....	43
Polímeros sintéticos	43
De origen biológico	43
Basados en estructuras de carbono	43
Cerámicas	44
Células Madre.....	47
Células Totipotentes.....	48
Células Pluripotentes	48
Células Multipotentes	48
Células Oligopotentes	48
Células Unipotentes	48
Células Madre Embrionales (ESC)	49
Células Madre Adultas	49
Células Madre <i>Tissue-Resident</i>	50
Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPSC)	50
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	54
MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
Análisis de los niveles relativos de expresión de las proteínas mediante el etiquetado iTRAQ	57
Obtención muestras biológicas.....	57
Células madre mesenquimales de médula ósea	57
Células madre de tejido adiposo	58

Células madre de pulpa dental.....	60
Cultivos celulares.....	61
Expansión	61
Recuento celular.....	62
Control contaminación: <i>Mycoplasma spp.</i>	63
Criogenización/conservación de las MSCs	66
Caracterización celular	67
Citometría de Flujo.....	67
Diferenciación <i>in vitro</i>	68
Análisis de imagen.....	70
Comportamiento biológico de las MSCs cultivadas sobre <i>scaffolds</i> biocerámicos	71
Biomateriales cerámicos	71
Formación de constructos.....	71
Test de viabilidad y actividad celular	72
Compromiso osteogénico	73
Microscopía electrónica de barrido (MEB)	75
Análisis estadístico	76
RESULTADOS	77
Análisis proteómico.....	78
Caracterización celular para MSC.....	78
Proliferación celular	80
Cuantificación del potencial osteogénico <i>in vitro</i> de las MSCs	83
Ensayos MSCs cultivadas sobre CaPs	84
Ensayos de viabilidad y actividad celular	84
Evaluación de la colonización del biomaterial y comportamiento celular	91
Actividad ALP	96
DISCUSIÓN.....	98
CONCLUSIONES	106
CONCLUSIONS	108
REFERENCIAS.....	110
Referencias de la sección Introducción.....	111
Referencias de la sección Material y Métodos	128
Referencias de la sección Discusión.....	130
ANEXO I	134
Tabla Anexo 1	135
Tabla Anexo 2	136

Tabla Anexo 3	137
Tabla Anexo 4	139
Tabla Anexo 5	139
ANEXO II	141
Publicaciones realizadas durante la realización de la Tesis Doctoral no incluidas en la memoria	142

ABREVIATURAS

ALP	fosfatasa alcalina, del inglés <i>alkaline phosphatase</i> , es una enzima hidrolasa de grupos fosfatos.
ARN	ácido ribonucleico.
ARNr	ARN ribosomal o ribosómico, implicado en la síntesis de proteínas.
ASC	células madre aisladas del tejido adiposo, del inglés <i>adipose-derived stem cells</i> .
BM-MSC	células madre aisladas de la médula ósea, del inglés <i>bone marrow mesenchymal stem cells</i> .
BMP	del inglés <i>bone morphogenetic protein</i> , es una familia de proteínas que actúan como factores de crecimiento y tienen capacidad de inducir la formación de hueso y cartílago.
β-TCP	beta-fosfato tricálcico, del inglés <i>beta tricalcium phosphate</i> , material cerámico de origen sintético.
CaP	fosfato de calcio.
CD105	del inglés <i>cluster of differentiation 105</i> , es una glipoproteína de membrana y marcador de células endoteliales humanas; también denominado endoglinta.
CD14	del inglés <i>cluster of differentiation 14</i> , es una glicoproteína característica de monocitos y precursores.
CD34	del inglés <i>cluster of differentiation 34</i> , es una proteína de membrana característica de células progenitoras hematopoyéticas.
CD45	del inglés <i>cluster of differentiation 45</i> , presente en todas las células hematopoyéticas excepto los eritrocitos; también denominado antígeno común leucocitario.
CD73	del inglés <i>cluster of differentiation 73</i> , enzima de superficie celular característico de linfocitos; también denominado NT5E o E5NT.
CD90	del inglés <i>cluster of differentiation 90</i> , proteína de superficie celular expresada en células madre, fibroblastos, neuronas y células endoteliales; también denominado THY1.
CÉLULAS NK	del inglés <i>natural killer</i> ; son un tipo de linfocitos producidos en la médula ósea que forma parte de la respuesta inmune innata.
CFU-GM	del inglés <i>colony forming unit granulocyte/macrophage</i> .
C-MYC	miembro de la familia de proto-oncogenes MYC.
CTR	del inglés <i>calcitonin receptor</i> ; también denominado CALCR.
DKK1	del inglés <i>Dickkopf-related protein 1</i> .
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> .
DMP1	del inglés <i>dentin matrix acidic phosphoprotein 1</i> .
DMSO	dimetilsulfóxido.
DP-MSC	células madre aisladas de la pulpa dental, del inglés <i>dental pulp mesenchymal stem cells</i> ; también denominada DPSC.
DSTN	destrin; también denominado ACTDP o DSN.
ESC	célula madre embrionaria, del inglés <i>embryonic stem cell</i> .
FADH₂	forma reducida de flavín adenín dinucleótido (FAD+), coenzima en reacciones óxido-reducción.
FBS	suero fetal bovino, del inglés <i>fetal bovine serum</i> .
FGF23	factor de crecimiento fibroblástico 23, del inglés <i>fibroblast growth factor 23</i> , producido por el osteocito.
FLNA	filamina A, proteína del citoesqueleto celular; también denominada FLN-1 o FLN.
FMNH₂	forma reducida de flavín mononucleótido (FMN+), coenzima en reacciones óxido-reducción.

GRP78	proteína de unión a inmunoglobulina, del inglés <i>binding immunoglobulin protein</i> ; también denominado HSPA5 o BiP.
HA	hidroxiapatita, mineral formado fosfato de calcio cristalino.
HSC	célula madre hemapoyética, del inglés <i>hematopoietic stem cell</i> .
IBP3	proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina, del inglés <i>insulin-like growth factor-binding protein 3</i> ; también denominado IGFBP3.
IgG1	inmunoglobulina 1.
IgG2a	inmunoglobulina 2a.
IHH	del inglés <i>Indian hedgehog homolog</i> .
iPSC	célula madre pluripotente inducida, del inglés <i>induced pluripotent stem cell</i> .
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular, del inglés <i>International Society for Cellular Therapy</i> , institución científica fundada en 1992 que promueve la investigación traslacional en terapia celular.
KLF4	factor Krupper 4, del inglés <i>Krueppel-like factor 4</i> ; también denominado EZF o GKLF.
LIN28	proteína LIN-28 homóloga A; también denominado LIN28A.
M-CSF	factor de estimulación de colonias de macrófagos 1, del inglés <i>macrophage colony-stimulating factor 1</i> ; también denominado CSF-1.
MEB	microscopio electrónico de barrido.
miARN	micro ARN, implicado la regulación de la expresión génica.
MMP14	metaloproteasa de la matriz extracelular 14, del inglés <i>matrix metalloproteinase-14</i> .
MMP9	metaloproteasa de la matriz extracelular 9, del inglés <i>matrix metalloproteinase-9</i> ; también denominada CLG4B.
MSC	célula madre mesenquimal, del inglés <i>mesenchymal stem cell</i> .
NADPH	forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP+), coenzima de varias rutas metabólicas.
NANOG	proteína homeobox NANOG.
OCT-04	proteína de unión al octámero 4, del inglés <i>octamer-binding protein 4</i> ; también denominada POU5F1.
OPG	osteoprotegerina; también denominada OCIF o TNFRSF11B.
OSX	osterix, es un factor de transcripción específico de osteoblastos; también conocido como SP7.
PALLD	palladin.
PBS	del inglés <i>phosphate buffered saline</i> .
RANKL	ligando del receptor del factor nuclear Kappa-B, del inglés <i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> ; también denominado OPGL, TNFSF11.
RUNX2	del inglés <i>runt-related transcription factor 2</i> ; también denominado CBFA1.
SOX2	factor de transcripción SOX-2; también denominado SRY-box 2.
T175	placa de cultivo celular de 175cm ² de superficie.
T25	placa de cultivo celular de 25cm ² de superficie.
T75	placa de cultivo celular de 75cm ² de superficie.
TCP	fosfato tricálcico.
TNAP	fosfatasa alcalina no específica de tejido, del inglés <i>tissue-nonspecific alkaline phosphatase</i> .
TRAP	del inglés <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i> ; también denominado ACP5.

RESUMEN

La regeneración y remodelación ósea pueden considerarse como las dos caras de una moneda ya que ambos procesos consisten en la formación de hueso nuevo pero que suceden en distintas situaciones. Mientras la remodelación es un proceso que se da a lo largo de la vida, la regeneración se produce principalmente durante la curación de hueso. Es sabido que en el caso de fracturas o lesiones óseas pequeñas el hueso tiene una capacidad innata reparativa sin que haya formación de cicatriz. Estos procesos regenerativos se ven superados en gran medida por algunos daños óseos mayores; como es el caso de las cirugías de reconstrucción, los defectos óseos de distinto origen (traumático, infeccioso y tumoral) o las displasias esqueléticas congénitas. En la actualidad, las estrategias de cirugía ortopédica consideradas como *gold-standard* son los injertos óseos (tanto autólogos como alogénicos) y la osteodistracción, pudiendo combinarse con el uso de factores de crecimiento o *scaffolds* osteoinductores. Aun así, la recuperación exitosa de las propiedades biomecánicas del hueso es limitada. Con el fin de superar estas limitaciones, se han desarrollado nuevas estrategias como las técnicas de ingeniería de tejidos basadas en materiales híbridos compuestos por células osteoprogenitoras, como las células madre mesenquimales (MSCs), y *scaffolds* de cerámica bioactivos.

Las biocerámicas basadas en el fosfato de calcio (CaPs) se han empleado clásicamente tanto en medicina, especialmente en cirugías maxilofaciales, como en odontología, en implantes dentales, durante más de 30 años. Las CaPs son biocompatibles, osteoconductoras, osteoinductoras y, en algunos casos, bioactivas. Debido a estas propiedades, las CaPs son ampliamente empleadas en la fabricación de *scaffolds* tanto para ingeniería de tejidos como regeneración ósea. Entre las distintas CaPs, las que más atención han recibido han sido la hidroxiapatita (HA) y el beta-fosfato tricálcico (β -TCP). La relación Ca:P determina propiedades como la solubilidad y la resorción en el cuerpo; la HA se considera relativamente no biodegradable mientras que el β -TCP se degrada fácilmente y acaba siendo reemplazado completamente por hueso formado después de su implantación.

En la Medicina Regenerativa el uso de MSCs constituye una alternativa prometedora a las técnicas quirúrgicas tradicionales en el contexto de regeneración ósea, donde se ha avanzado poco en el desarrollo de nuevas metodologías. Las MSCs humanas adultas pueden aislarse de casi todos los tejidos y son multipotenciales, lo que les permite diferenciarse en células de varios linajes mesenquimales (cartílago, hueso, tendones, músculos y adipocitos) entre otros múltiples tipos de células. Aunque las MSCs aisladas de distintas localizaciones anatómicas presentan características fenotípicas similares, sus propiedades funcionales varían. A este respecto, poco está esclarecido en cómo la localización de origen influye en las propiedades osteogénicas de las MSCs.

Las MSCs de médula ósea (BM-MSCs), las primeras MSCs descritas y por ello consideradas como las MSCs de referencia, han sido ampliamente estudiadas y empleadas en los últimos años en estudios sobre posibles terapias regenerativas. Las MSCs derivadas de tejido adiposo (ASCs) poseen varias ventajas sobre las MSCs de otras localizaciones: los depósitos de grasa son ubicuos en el cuerpo humano, el acceso a ellas es fácil mediante una mínima invasión y es un tejido con una alta densidad celular por lo que existe la posibilidad de obtener un gran número de células; también se ha descrito su capacidad para promover la osteogénesis en modelos animales. Recientemente, han acaparado atención las MSCs aisladas de la pulpa dental (DP-MSCs), generalmente aisladas tras la exodoncia de muelas del juicio por lo que se considera una fuente no invasiva de MSCs. Entre sus características están una elevada capacidad proliferativa y fácil diferenciación a odontoblastos, osteoblastos y condrocitos. Además, han sido propuestas para ser empleadas en terapias regenerativas en patologías óseas.

Aunque en los últimos años se han llevado a cabo varios estudios en los que se comparaban MSCs de distintos orígenes, en el contexto específico de regeneración ósea, aún queda por esclarecer la influencia que tiene el tejido de origen y la cerámica usada como *scaffold* en el potencial osteogénico de las MSCs. El objetivo final de este trabajo fue definir cuál es la fuente de MSCs y constructo con mayor potencial osteogénico e interés para su aplicación clínica en el contexto de regeneración ósea.

La hipótesis de partida de esta Tesis Doctoral surgió del análisis de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio a raíz de un análisis proteómico comparativo mediante la técnica iTRAQ de MSCs aisladas de cartílago y hueso subcondral. Se identificaron 50 proteínas, de las cuales 5 habían sido previamente relacionadas con el proceso osteogénico. Basándonos en este perfil proteómico se planteó la hipótesis de que una proximidad anatómica de las MSCs al hueso tiene un efecto directo sobre su fenotipo, en forma de un mayor compromiso osteogénico.

Posteriormente, se realizó la caracterización fenotípica de las células aisladas de la médula ósea, tejido adiposo y pulpa dental confirmando que éstas cumplían los criterios para ser consideradas MSCs. Las distintas MSCs se cultivaron en superficies de plástico y se estudió si existían diferencias funcionales entre ellas en esta superficie; en concreto, se evaluó la capacidad proliferativa calculando el tiempo de duplicación y el potencial osteogénico mediante la tinción de Rojo Alizarina de las MSCs de cada localización anatómica. Los resultados establecieron que las DP-MSCs eran tanto las MSCs con la mayor capacidad proliferativa como las MSCs con mayor capacidad osteogénica de los tres tipos analizados.

En la última parte se estudió el comportamiento de las MSCs cultivadas sobre CaPs. Primero se comprobó si existía efecto alguno de la porosidad de la CaP monitorizando la viabilidad/actividad celular que mostraban las MSCs sobre *scaffolds* de β -TCP con 4 grados de porosidad. Los resultados determinaron que las diferencias eran mínimas y, consecuentemente, la porosidad no tenía ningún efecto significativo sobre la viabilidad/actividad celular. También se comprobó una relación directa entre el número de células sembradas y la viabilidad/actividad celular que mostraban las MSCs.

Finalmente, se evaluó el comportamiento de las distintas MSCs sobre ambas CaPs: la viabilidad se determinó en función de la actividad metabólica; la colonización del biomaterial, la adhesión y organización celular mediante MEB; y el compromiso osteogénico, o la mayor o menor capacidad osteogénica, se determinó cuantificando la actividad ALP. Los resultados evidenciaron que las DP-MSCs son las MSCs con mayor capacidad de colonizar las biocerámicas al ser las únicas que formaron una capa celular completa en ambas CaPs, describieron un comportamiento diferencial de las MSCs en términos de actividad celular según su localización anatómica y la CaP con la que interactúa y mostraron una tendencia en la que las DP-MSCs son las MSCs con un mayor aumento de la actividad ALP en términos relativos.

ABSTRACT

Bone regeneration and bone remodeling can be considered as two sides of the same coin, since they are both bone formation processes, but happen in different circumstances. While bone remodeling is a life-long process, bone regeneration occurs mainly during bone healing. It is known that for small fractures or injuries, the bone has an innate ability to repair itself without scarring. These regenerative processes are largely surpassed by major bone damage such as skeletal reconstruction surgery, bone defects of varied origins (traumatic, infectious and tumoral) or congenital skeletal dysplasias. Current orthopedic surgery strategies considered as gold-standard are bone grafting (both autologous and allogenic) and osteodistraction. They can be combined with the use of growth factors or osteoinductive scaffolds. However, the successful recovery of the bone biomechanical properties is limited. In order to bypass these limitations, new strategies have been developed. Such are tissue engineering techniques based on hybrid materials made up of osteoprogenitor cells, like mesenchymal stem cells (MSCs), and bioactive ceramic scaffolds.

Calcium phosphate-based (CaPs) bioceramics have been used both in medicine, especially in maxillo-facial surgeries, and dentistry, in dental implants, for over 30 years. CaPs are biocompatible, osteoconductive, osteoinductive and, in some cases, bioactive. Due to these properties, CaPs bioceramics are widely used to fabricate scaffolds for bone regeneration and tissue engineering. Among the different CaPs bioceramics, hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP) have received the most attention. The Ca:P ratio determines properties such as the solubility and tendency for resorption in the body. HA is considered relatively non-biodegradable while β -TCP degrades readily and can be completely replaced by newly formed bone after implantation.

The use of MSCs in Regenerative Medicine constitutes a promising alternative to traditional surgical techniques in bone regeneration, where little progress in the development of new methodologies has been achieved. Adult MSCs can be isolated from almost any tissue and are multipotential since they can differentiate into cells of several mesenchymal lineages (cartilage, bone, tendons, muscles and adipocytes), among other cell types. Even though MSCs derived from different sources present similar phenotypic characteristics, their functional properties vary. In this sense, little is known about the influence of the source and/or anatomic location on MSCs osteogenic properties.

Bone marrow MSCs (BM-MSCs) were the first described MSCs and are often considered as the gold-standard in MSCs. They have been widely used and studied in trials looking for potential regenerative therapies in the last years. Adipose-derived MSCs (ASCs) present several advantages compared to MSCs obtained from other sources: adipose depots are ubiquitous in the body, easily accessible with minimum invasion and contain a large number of cells. Furthermore, their capacity to promote osteogenesis in animal models has been described. Recently, MSCs isolated from dental pulp (DP-MSCs) have gained attention. They are usually isolated after surgical removal of wisdom teeth, so they are considered as a non-invasive source of MSCs. DP-MSCs present a high proliferative capacity and easily differentiate into odontoblasts, osteoblasts, and chondrocytes. DP-MSCs have been proposed for use in regenerative therapies for bone diseases.

Although in the last years several studies in the context of bone regeneration have been published, comparing MSCs derived from various sources, clarification is still needed regarding the influence of the cell source and bioscaffold used in the osteogenic potential of MSCs. The aim of this study is to define the MSC source and construct (MSC and scaffold combination) with

the highest osteogenic potential, and that is most interesting for its clinical application in the context of bone regeneration.

The starting hypothesis of this Doctoral Thesis emerged from the analysis of the results obtained from a comparative proteomic analysis by iTRAQ technique of MSCs isolated from cartilage and subchondral bone, previously carried out in our laboratory. Fifty proteins were identified, 5 of which have already been related to the osteogenic process. Based on this proteomic profile, we hypothesized that an anatomic proximity to the bone has an effect on MSCs phenotype, in the form of an increased osteogenic commitment.

Afterwards, phenotypic characterization of cells isolated from bone marrow, adipose tissue and dental pulp was performed. It was confirmed that cells met the criteria to be considered MSCs. The different MSCs were cultured on plastic surfaces, and we studied any functional differences between them. Specifically, the proliferative capacity was evaluated by calculating the duplication time, and the osteogenic potential was assessed by Alizarin Red staining, for MSCs from each anatomic location. Results established that DP-MSCs were the MSCs with both the highest proliferation capacity and the greatest osteogenic potential of the three analyzed cell types.

The last part was dedicated to of the study of the behavior of MSCs cultured on CaPs. First, we assessed whether there exists any effect of the CaP porosity exists on cell viability/activity, by monitoring the viability/activity shown by MSCs on β -TCP scaffolds with 4 grades of porosity. Results determined that existing differences were minimum and, consequently, porosity has no significant effect on cell viability/activity. There is also a direct relationship between the number of cells seeded and the cell viability/activity shown by MSCs.

Finally, the behavior of MSCs on both CaPs was evaluated. Viability was established as a function of metabolic activity. Colonization of the biomaterial, cell adhesion and cellular organization were determined using SEM. Lastly, the osteogenic commitment, or osteogenic capacity, was determined by quantifying ALP activity. Results show that DP-MSCs are the MSCs with the greatest capacity to colonize bioceramics, since they were the only ones that formed a complete cell layer in both CaPs. Results also highlight a differential behavior of MSCs in terms of cell activity according to the anatomic location and the CaP with which they interact. Furthermore, results show a trend for DP-MSCs are the MSCs, with the most robust increase in the ALP activity in relative terms.

INTRODUCCIÓN



Figura 1. "Prometeo encadenado", cuadro realizado por el pintor flamenco Pedro Pablo Rubens en 1618 que muestra al águila Etón comiendo el hígado de Prometeo, el cual cada noche se regeneraba. Este mito de la Antigua Grecia es un claro ejemplo de cómo en el imaginario del ser humano el concepto «regeneración de tejidos» está presente desde tiempos antiguos.

Visión histórica de la Medicina Regenerativa

Pese a que la «medicina regenerativa» es un área de investigación que acapara gran interés en la actualidad, la realidad es que el concepto de regeneración de tejidos existe para el ser humano desde hace siglos tal como demuestran, entre otras referencias culturales antiguas, la creación de Eva, narrada en el libro de Génesis de la Biblia, a partir de una costilla de Adán o el mito griego de Prometeo: castigado por Zeus por desobedecerle y entregar a la humanidad el fuego. Su castigo: ser atado a una roca y cada día el águila Etón le devoraba el hígado, el cual se regeneraba durante la noche con el fin de que el castigo fuera eterno (Figura 1). Prometeo, 30000 años después, finalmente fue liberado por Heracles y perdonado definitivamente por Zeus ya que esta hazaña ayudaba a la glorificación de Heracles, que era hijo suyo. Es un hecho interesante que el hígado sea el único órgano del cuerpo humano que tiene reconocida la capacidad de regenerarse por sí mismo tras una lesión, de lo cual los antiguos griegos parecían ser conscientes ya que denominaron al hígado *hepar* (ήπαρ), que proviene de *hepaomai* (ηπάομαι) y significa “repararse a sí mismo”. También de la antigua Grecia data el primer texto científico que se refiere a la regeneración de tejidos: Aristóteles teoriza acerca de una capacidad de regeneración en los organismos, tras realizar un estudio con las colas de salamandras, en “La generación de los animales” (Cole, 1944).

Según la tradición cristiana, a finales del Siglo II de la Era Común se sitúan los hermanos médicos San Cosme y San Damián, célebres por ejercer la profesión sin cobrar, a la sazón santos patronos de la Medicina, y a los que se les atribuye el “milagro” de trasplantar la pierna de un esclavo, muerto recientemente, a un enfermo (Matthews, 1968).

En la Edad Moderna tanto la generación como regeneración de los organismos volvieron a acaparar la atención de la comunidad científica que se dividió en dos escuelas. La primera de ellas era el “Preformacionismo”, cuyo máximo auge fue desde mediados del Siglo XVII a mediados del Siglo XVIII, que defendía la teoría según la cual los órganos o apéndices a ser regenerados y los organismos a nacer existían previamente como miniaturas por lo que la regeneración o generación no eran sino el crecimiento de estas miniaturas. La segunda era el “Epigenetismo”, término acuñado por el médico inglés William Harvey, que se inspiraba claramente en la tesis aristotélica que defendía que los procesos regeneración y generación eran el resultado de la diferenciación de una materia original indiferenciada y homogénea (Horch, Popescu, & Polykandriotis, 2016).

En el Siglo XVIII la regeneración fue intensamente estudiada, en distintos modelos animales, por numerosos polímatas. Abraham Trembley, matemático e historiador natural, en 1744 realizó múltiples trabajos realizando distintos cortes en hidras para dilucidar si se trataba de una planta o un animal siendo pionero en llevar a cabo la manipulación de organismos vivos para resolver cuestiones biológicas (Weaver & Garry, 2008). René Antoine Ferchault de Réaumur, un prestigioso metalúrgico, estudió la regeneración de las patas en cangrejos de río por primera vez con un acercamiento científico (Weaver & Garry, 2008). Por último, Lazzaro Spallanzani, un abogado, matemático, filósofo y cura católico llevó a cabo experimentos en anfibios (ranas, sapos), babosas y caracoles en los que descubrió la regeneración de cola y extremidades que finalmente publicó en 1768 en un trabajo titulado “Prodromo” (Weaver & Garry, 2008). Estos descubrimientos, sumados a los obtenidos por otros investigadores coetáneos, apoyaron que a finales del Siglo XVIII el debate filosófico-religioso quedase alejado de la regeneración, imponiéndose entre la comunidad científica el epigenetismo. A finales del siglo XVIII destacan los trasplantes de aloinjertos en animales, publicados por el cirujano escocés John Hunter, que

están considerados como el inicio de una disciplina clave en la medicina regenerativa: el «trasplante de órganos».

El trabajo de Hunter se vio continuado en la primera mitad del Siglo XIX en una serie de trabajos que sentaron las bases sobre las que se ha desarrollado la medicina de los trasplantes. En 1816, el cirujano inglés Joseph Carpue realizó la primera restauración de nariz en humanos usando injertos apoyado en técnicas empleadas con anterioridad por cirujanos indios (Carpue, 1816); posteriormente, Johann Friedrich Dieffenbach llevó a cabo reconstrucciones del ano, uretra y cara (Goldwyn, 1968); Jaques-Louis Reverdin describió un método para el primer trasplante de piel (Horch et al., 2016); en 1824, Franz Riesinger intentó trasplantar córneas de ratones en humanos sin el éxito que sí tuvo Samuel Bigger en 1837 al trasplantar la córnea de una gacela a otra logrando una total recuperación (Moffatt, Cartwright, & Stumpf, 2005). A nivel celular, en 1939 los alemanes Theodor Schwann y Jakob Schleiden postularon que la célula es la unidad básica de vida tanto en plantas como animales y Rudolf Virchow, después de varias observaciones microscópicas, en 1855 confirmó y completó los postulados añadiendo que todas las células provenían de otras células (Ribatti, 2018). Además, en 1867 el alemán Julius Cohnheim sugirió que las células que realizaban la reparación de las heridas provenían del torrente sanguíneo (Wohlrab & Henoch, 1988). Estos postulados dieron paso a la exploración de opciones terapéuticas para tejidos u órganos dañados a partir de células.

Pese al éxito de otras ramas de la ciencia, el interés por el estudio de la generación y regeneración no se vio afectado, manteniéndose a lo largo del siglo XIX tanto en Europa como en América del Norte, donde se realizaron multitud de experimentos y observaciones sobre la regeneración en modelos animales por parte de historiadores naturales, zoólogos y anatomistas. Un ejemplo de ello es Thomas Hunt Morgan que enfocó sus primeras investigaciones una realizada su tesis doctoral, sobre la embriología de las arañas de mar, a la regeneración y desarrollo larvario antes de mudarse a California y comenzar a trabajar en la posteriormente famosa *fly-room* en la cual se realizaron grandes descubrimientos en el área de la Genética y cuya importancia se vio reconocida con el premio Nobel de Medicina en 1933.

A principios del Siglo XX, en el Instituto Rockefeller para la Investigación Médica (actual Universidad Rockefeller), el francés Alexis Carrel (premio Nobel de Medicina en 1912) inició el cultivo de un pequeño corte de miocardio proveniente de un embrión de pollo. Este cultivo se continuó durante más de 30 años y se le considera el inicio de los cultivos celulares modernos (Witkowski, 1979). El establecimiento de líneas celulares estables en el laboratorio y la consecuente posibilidad de obtener un gran número de células de un tipo celular específico fue un avance muy importante. En la década de 1970, el traumatólogo William T. Green realizó varios experimentos en ratones intentando generar cartílago a partir de condrocitos cultivados en astillas de hueso sin éxito pero conjeturó que sería posible la generación de nuevo tejido usando otro soporte, andamiaje o *scaffold* (C. Vacanti, 2006). Años más tarde, Green empleó matrices de colágeno en las que había cultivado queratinocitos para tratar a pacientes de quemaduras mientras que Eugene Bell sembró fibroblastos en geles de colágeno logrando lo que denominó “equivalentes de piel” (Bell, Ehrlich, Buttle, & Nakatsuji, 1981; C. Vacanti, 2006). Estos trabajos junto con el trabajo de Robert Langer y Joseph P. Vacanti desarrollando matrices para transportar células (J. P. Vacanti et al., 1988) son el inicio de lo que se acabó denominando «ingeniería de tejidos» (Langer & Vacanti, 1993), pilar de la medicina regenerativa. Charles Vacanti, hermano de Joseph Vacanti, llevó a cabo en la década de 1990 varios trabajos de reconstrucción de órganos, como la reconstrucción del hueso de pulgar empleando una matriz de coral con osteoblastos (C. Vacanti, 2006), aunque su trabajo más famoso y el que dio una

gran presencia mediática y popularidad a la ingeniería de tejidos fue el conocido como “auriculosaurus” (Figura 2), consistente en un implante, en el dorso de ratones *nude*, de un *scaffold* polimérico con forma oreja de un individuo de 3 años que contenía condrocitos (Cao, Vacanti, Paige, Upton, & Vacanti, 1997).



Figura 2. Ratón Vacanti, también conocido popularmente como *auriculosaurus*, desarrollado en el laboratorio del Dr. Charles Vacanti a comienzos de la década de 1990 como demostración del potencial alcance que poseía la Ingeniería de Tejidos.

El primer acercamiento a la denominada «terapia celular» surge de la hipótesis propuesta por Cohnheim que defendía la existencia de cierto tipo celular que poseía potenciales reparativos. En la segunda mitad del Siglo XX, estudios realizados en teratocarcinomas de ratones establecieron que éstos procedían de células germinales que podían dar lugar a diferentes tejidos permitiendo a Lewis J. Kleinsmith y Barry Pierce introducir el concepto de pluripotencialidad (Kleinsmith & Pierce, 1964). En la década de 1970 abundaron los estudios empleando las células germinales que en cultivo podían mantenerse en un estado de indiferenciación o entrar en diferenciación debida a una alta densidad celular, aunque su potencial uso estaba limitado por las anomalías cromosómicas inherentes a ellas y por su incapacidad de diferenciarse en células germinales. Esta limitación fue superada en 1981 cuando Gail Martin en Estados Unidos y Martin Evans junto a Matthew Kaufman en Inglaterra, empleando un modelo murino, lograron el aislamiento de líneas celulares estables con capacidad para diferenciarse en cualquier tejido adulto, siendo Gail Martin el que se refirió a ellas como “células madre embrionarias” (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Lógicamente, el siguiente reto era lograr su aislamiento en humanos, pero hubo que esperar hasta que se produjeran los avances tecnológicos que lo posibilitaran en la década de 1990. Definitivamente, en 1998, James Thomson logró el aislamiento y cultivo de la primera línea de células madre embrionarias de humanos a partir de blastocitos (Thomson et al., 1998). También cobraron relevancia en la investigación biomédica las células madre adultas, cuyo estudio se inició con los trabajos realizados por Alexander Friedenstein en las décadas de 1960-70 en los que demostró que la médula ósea contenía una población celular responsable del potencial osteogénico e hipotetizaba con la posible existencia de células madre en la médula ósea que posteriormente fue confirmada (Bianco, Robey, & Simmons, 2008). Estas células madre diferían de las células hematopoyéticas por su rápida adhesión a la superficie de cultivo y por su forma parecida a los fibroblastos y las denominó “célula madre osteogénica” (Friedenstein, Chailakhyan, & Gerasimov, 1987). Años después, Arnold Caplan propuso el nombre que reciben en la actualidad,

células madre mesenquimales, y describió que, bajo condiciones adecuadas de cultivo, pueden diferenciarse en cualquier tipo celular de origen mesenquimal (Caplan, 1991, 1994). La habilidad para aislar y cultivar líneas de células madre, tanto embrionarias como mesenquimales, abrió una nueva era en la terapia celular. En la medicina moderna, los primeros ensayos en el contexto de la regeneración de órganos y células madre fueron los intentos de trasplante de médula ósea en modelos animales que posibilitaron la realización de este tipo de trasplante en humanos a finales de la década de 1950 y que a día de hoy son un tratamiento habitual (Dameshek, 1957; de la Morena & Gatti, 2010).

Entre todos estos logros y avances científicos destaca la primera clonación de un mamífero (Wilmut, Schnieke, McWhir, Kind, & Campbell, 1997), que impulsó la creación de unas expectativas para el campo de la regeneración con aplicaciones médicas poco realistas incluso en la comunidad científica (Kratz & Huss, 2003). La realidad es que el gran número de investigaciones y trabajos realizados en el área al comienzo del Siglo XXI también evidenciaron la existencia de limitaciones biológicas para la ingeniería de tejidos (Horch et al., 2016). Simultáneamente, la terapia celular había ganado interés debido a las propiedades y potencial terapéutico de las células madre (Howell & Wells, 2011; G. Ren et al., 2012); el desarrollo tecnológico en el campo de la genética permitiendo la manipulación genética avanzada (Venken & Bellen, 2005) y en el campo de los biomateriales se exploraban nuevas aproximaciones (Beier et al., 2009). Consecuentemente, todas estas disciplinas se aúnan bajo el término «medicina regenerativa». Este término, que ya fue empleado con anterioridad (Kaiser, 1992), fue popularizado por William Hazeltine tras organizar anualmente entre 2000-2003 conferencias en Washington DC y fundar la revista científica digital *Regenerative Medicine* (Lysaght & Crager, 2009).

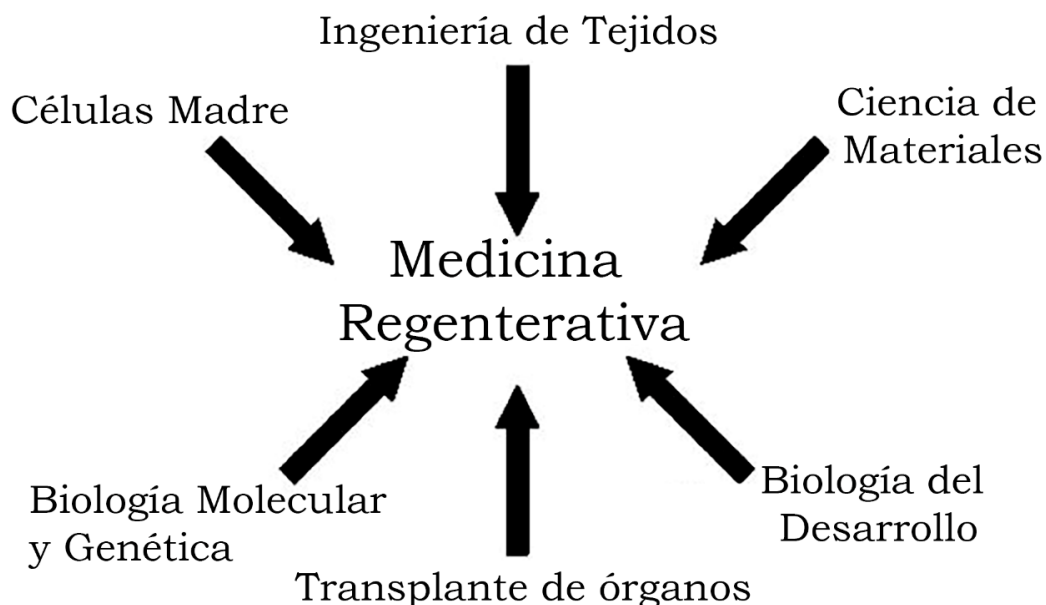


Figura 3. Diagrama que representa las distintas disciplinas que conjuntamente contribuyen al desarrollo y avance de la Medicina Regenerativa. Modificado a partir de (Daar & Greenwood, 2007).

Conceptualmente, aunque el término «medicina regenerativa» incluye la creación artificial de órganos y su posterior implante, una definición más realista de la medicina regenerativa la propuso Daar *et al.* en 2007: “un campo emergente e interdisciplinario de investigación y aplicaciones clínicas enfocadas a la reparación, reemplazo o regeneración de células, tejidos u órganos para restaurar la función dañada resultante de cualquier causa, incluyendo defectos congénitos, enfermedades, traumatismos y envejecimiento” (Daar & Greenwood, 2007). Su desarrollo y evolución son el resultado de una sinergia entre distintas disciplinas científicas (Figura 3). Más recientemente, el mismo autor consideró a la medicina regenerativa como “la evolución natural de los actuales trasplantes de órganos” al compartir su finalidad: restaurar o reemplazar a un órgano (Daar, 2013). Hipotéticamente, es esperable en un futuro la desaparición del trasplante de órganos en su actual concepción. La estrategia terapéutica, en ese caso, consistiría en la deposición de una suspensión celular, opcionalmente en combinación con un *scaffold*, en el órgano diana donde ésta realizará la función de restauración del órgano regenerándolo y recuperando su función (Salgado et al., 2013).

La medicina regenerativa tiene dos objetivos principales (M. Z. Ratajczak, Jadczyk, Pędziwiatr, & Wojakowski, 2014): (1) El uso eficiente y seguro de las células madre y (2) La optimización del potencial regenerativo de las células madre adultas localizadas en distintos órganos. La consecución de estos objetivos se afronta mediante el uso de tres estrategias terapéuticas (Hipp & Atala, 2008): (1) la terapia celular, empleando células vivas, (2) la utilización de diferentes *scaffolds* de materiales biocompatibles que dan soporte y facilitan la reparación del tejido u órgano dañado (Henson & Getgood, 2011) y (3) el uso combinado de *scaffolds* y células madre. Tal como se ha descrito anteriormente, para las terapias celulares pueden diferenciarse dos tipos de aproximaciones: la utilización de células maduras ya diferenciadas y en las que se emplean células madre, tanto embrionarias como adultas.

Estrategias para la regeneración del tejido óseo

La regeneración y la remodelación ósea son dos procesos bien conocidos durante la formación de nuevo tejido óseo. Si bien la remodelación es un proceso continuo a lo largo de la vida, la regeneración se produce principalmente durante la curación del hueso de la fractura y otras condiciones (Dimitriou, Jones, McGonagle, & Giannoudis, 2011). La regeneración ósea es un proceso fisiológico complejo y bien organizado en el que participan distintos tipos celulares y varias vías de señalización tanto intra como extracelulares en una secuencia temporal y espacial específica. Es conocido que cuando se trata de fracturas o lesiones de pequeño tamaño, el hueso presenta capacidad innata de reparación suficiente sin formación de cicatriz (Einhorn, 1998) pero este proceso es superado en gran medida por el daño del hueso, tal como ocurre en daños óseos traumáticos, de origen infeccioso, tumorales o displasias esqueléticas congénitas. Aunque en la literatura hay recogidos casos de reparación espontánea en huesos largos se consideran como casos excepcionales (Giannoudis, Calori, Begue, & Schmidmaier, 2013). Aprovechando esta fisiología particular del tejido óseo, entre las estrategias clínicas actuales para potenciar la regeneración del hueso la distracción ósea y los injertos óseos son considerados como el patrón o *gold-standard* (Dimitriou et al., 2011; Giannoudis et al., 2013).

La distracción ósea, introducida por Gavriil Ilizarov a mediados del Siglo XIX, consigue la formación ósea *de novo* como respuesta a una tensión aplicada en tres pasos: latencia, distracción y consolidación (Catagni, Guerreschi, & Lovisetti, 2011). La fase de latencia es el periodo de tiempo que transcurre desde la osteotomía hasta que comienza la distracción, normalmente dura hasta 7 días; durante la fase de distracción se da una separación de 1 mm al

día y, por último, la fase de consolidación tiene una duración de 8-12 semanas (Natu et al., 2014). Las principales desventajas de esta técnica son su larga duración y la posible afectación a la calidad de vida del paciente (Alzahrani, Anam, AlQahtani, Makhdum, & Hamdy, 2018; Paré et al., 2019). Los injertos óseos son utilizados en una gran variedad de intervenciones traumáticas y maxilofaciales por sus propiedades osteoinductoras. Los injertos autólogos son la opción prioritaria por sus propiedades osteoinductoras y osteoconductoras además de su histocompatibilidad, presencia de células osteoprogenitoras (Dahabreh et al., 2014; Pountos, Panteli, Panagiotopoulos, Jones, & Giannoudis, 2014). Los injertos se pueden obtener de distintos puntos de la anatomía aunque los más habituales son cresta ilíaca, costillas o huesos largos como el peroné (Giannoudis et al., 2013). Sin embargo, su uso presenta inconvenientes como: la disponibilidad limitada, la calidad variable del injerto y la necesidad de un proceso quirúrgico previo que incrementa los costes y riesgos sanitarios y por tanto desaconsejan su uso en pacientes con comorbilidades, especialmente en edades avanzadas. (Panteli, Pountos, Jones, & Giannoudis, 2015; St John et al., 2003). Como alternativa a los injertos autólogos están los injertos alogénicos provenientes de donantes vivos o de cadáveres. Con ellos, especialmente en los provenientes de cadáveres, se solucionan las comorbilidades para el paciente y la cantidad limitada del injerto. Por el contrario, como inconvenientes presentan propiedades osteoinductoras disminuidas y riesgo de sufrir rechazo o transmisión de infecciones (Finkemeier, 2002).

En el campo de los materiales se han desarrollado *scaffolds* osteoconductores, de origen sintético o natural, para sustituir a los injertos óseos. En la actualidad, existe una gran variedad de materiales empleados o estudiados para su uso en la regeneración ósea, entre los que destacan el coral y las biocerámicas (Arcos & Vallet-Regí, 2013; Pountos & Giannoudis, 2016). El descubrimiento y disponibilidad de factores de crecimiento osteoinductores, como las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), abrió una nueva vía en el tratamiento de fracturas mediante la promoción de la regeneración ósea (Argintar, Edwards, & Delahay, 2011; Nauth, Ristevski, Li, & Schemitsch, 2011). Pese a que aún no se ha determinado el volumen total de hueso que pueden formar, la experiencia clínica estima que las BMPs son válidas para defectos con un tamaño inferior a 2 cm (Giannoudis et al., 2013). Actualmente, BMP-2 y BMP-7 están aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*), agencia americana del medicamento, para su uso clínico en distintas condiciones óseas como las fracturas de hueso largo (Begam, Nandi, Kundu, & Chanda, 2017). Por último, existen métodos no invasivos para promover la regeneración ósea mediante estimulación biofísica como el ultrasonido pulsado de baja intensidad y la terapia de campo electromagnético pulsado (Hannemann, Mommers, Schots, Brink, & Poeze, 2014; Schofer, Block, Aigner, & Schmelz, 2010).

Sin embargo, la recuperación satisfactoria de las propiedades biomecánicas del hueso normal con estos métodos es limitada. Para superar algunas de esas limitaciones, entre las estrategias que han acaparado la atención figuran las técnicas de ingeniería de tejidos que combinan el desarrollo de materiales híbridos (constructos) compuestos por células osteoprogenitoras, como las células madre mesenquimales adultas (MSCs) sobre *scaffolds* de cerámica bioactiva (P. Wang et al., 2014).

Tejido Óseo

El esqueleto humano adulto está formado por 206 huesos (Neumann & Gest, 2019). Huesos y cartílago constituyen el sistema esquelético que, a su vez, integra al sistema locomotor. Aunque aparentemente el esqueleto humano sea una estructura inerte, la realidad es que, tal como describió Cooke, se trata de una estructura del cuerpo humano que presenta una alta actividad:

“El esqueleto, que no vemos y que a menudo olvidamos, es una formidable masa de tejido que acapara cerca del 9% del volumen del cuerpo y no menos del 17% de su peso. La estabilidad y la inmutabilidad de los huesos secos y su persistencia durante siglos, e incluso millones de años, después de que los tejidos blandos se hayan convertido en polvo, nos dan una falsa impresión del hueso vivo. Su inmutabilidad tras la muerte contrasta claramente con su incesante actividad durante la vida” (Cooke, 1955).

Junto con las funciones de apoyo estructural y movimiento, completan las funciones del hueso en el organismo la protección de órganos vitales y una función metabólica importante en el mantenimiento de la homeostasis mineral al actuar como reservorio de minerales (calcio, fosfatos y otros iones) (Clarke, 2008). En esta última función juega un papel principal el proceso de remodelado óseo, consistente en una sustitución continua del hueso viejo por hueso nuevo (Frost, 1964). El proceso de remodelación ósea es el resultado de una actuación secuencial de dos tipos celulares: los osteoclastos y los osteoblastos, cuya función biológica es regulada por los osteocitos (Kenkre & Bassett, 2018).

Estructura

Los huesos tienen una vaina fibrosa externa denominada periostio, la superficie interna en contacto directo con la médula se denomina endostio.

El periostio, tejido conjuntivo fibroso, recubre todas las superficies óseas a excepción de las articulaciones, que están recubiertas por cartílago articular. Además, el periostio contiene los vasos sanguíneos que posibilitan la nutrición del hueso, terminaciones nerviosas, osteoblastos y osteoclastos (Augat & Schorlemmer, 2006). La adherencia al hueso es llevada a cabo por las llamadas fibras de Sharpey, sólidas fibras de colágeno, que penetran en el tejido óseo.

El endostio es una vaina membranosa que, al igual que el periostio, contiene vasos sanguíneos, osteoblastos y osteoclastos. Además de la médula, el endostio recubre la superficie del hueso trabecular y los conductos de Volkman.

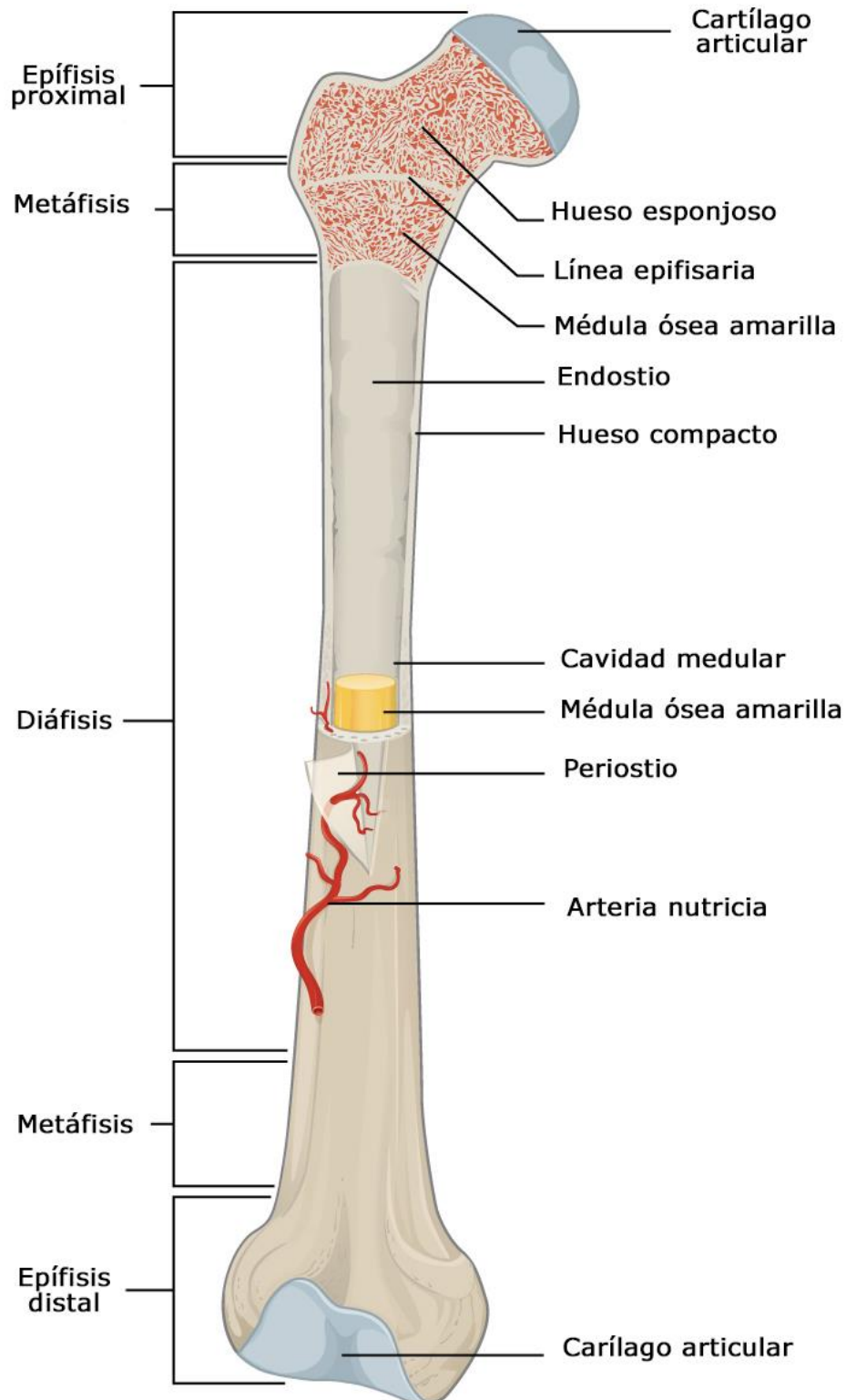


Figura 4. Esquema de la estructura macroscópica de un hueso largo. En él se muestran las distintas zonas anatómicas en las que se divide el hueso y componentes estructurales que lo componen.

Composición del hueso

El hueso es un tejido que se caracteriza por tener una matriz fisiológicamente mineralizada, clave para tener la dureza requerida para la función de sostén y protección. Embebidas en esta matriz, se encuentran distintos tipos celulares encargados de su regeneración continua a lo largo de toda la vida para mantener su estructura y funciones.

En la composición del hueso en adultos en términos generales, ya que ésta puede variar según edad, emplazamiento anatómico, dieta y estado de salud, la fase mineral constituye 40-50%, la matriz orgánica el 20-40%, el agua el 5-10% y los lípidos menos del 3% (Boskey & Robey, 2013).

Matriz ósea

La matriz ósea está formada por dos fases: la mineral (65%) y una orgánica (35%). La fase mineral aporta rigidez mecánica y fuerza para soportar las cargas mientras que la fase orgánica es la responsable de la elasticidad y flexibilidad; conjuntamente, ambas matrices permiten las propiedades biomecánicas del hueso.

La fase mineral está compuesta principalmente por el análogo humano de la hidroxiapatita geológica: $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. A diferencia de la forma geológica, la hidroxiapatita humana posee cristales minerales más pequeños, contiene impurezas (carbonato, magnesio o fosfato ácido) y vacíos (ausencia de OH^-). Estos cambios hacen que la forma humana sea más soluble que la geológica, facilitando la función metabólica del hueso y la liberación de componentes inorgánicos importantes como iones de calcio, fosfato y magnesio.

La fase orgánica está compuesta básicamente por fibras de colágeno tipo I y V. Estas fibras, junto con otros tipos minoritario de colágeno, componen el 85-90% de las proteínas presentes en el hueso y le confieren una relativa flexibilidad. El resto de proteínas representan entre el 10-15% del total de proteínas del hueso, siendo una cuarta parte de ellas de origen exógena. Debido a su gran afinidad por la hidroxiapatita se fijan a la matriz. Estas proteínas no colágenas se clasifican en:

- a. Macromoléculas de proteoglicanos: otorgan resistencia a la compresión.
- b. Glicoproteínas multiadhesivas: encargadas de la adhesión de células óseas a las proteínas de la fase orgánica. Osteonectina y osteopenina son ejemplos de ellas por su papel en la adhesión entre colágeno e hidroxiapatita y de las células a la matriz ósea, respectivamente.
- c. Proteínas dependientes de la vitamina K, entre ellas destaca la osteocalcina que tiene como función la captación de calcio y atraer a los osteoclastos para el remodelado óseo.
- d. Factores de crecimiento, como las BMPs, producidas por osteoblastos y reguladoras de la proliferación y diferenciación celular.
- e. Citoquinas con diversas funciones. Pueden tener efectos sobre la mineralización de la matriz. Factores de crecimiento y moléculas presentes en cantidades mínimas, que también pueden influir en la actividad local de las células óseas (Gokhale, Boskey, & Robey, 2001).

Componentes celulares del tejido óseo

El hueso es un tejido dinámico en cuya integridad (estructural, bioquímica y mecánica), su actividad metabólica y homeostasis mineral intervienen distintos tipos celulares:

Células osteoprogenitoras

Las células osteoprogenitoras derivan de células madre mesenquimales presentes en la médula ósea y son precursoras de los osteoblastos (Negishi-Koga & Takayanagi, 2012). Por lo tanto, son células madre específicas del tejido óseo. Físicamente están localizadas en el endostio y periostio (Calvi et al., 2003).

El primer paso es la diferenciación de la MSC a célula osteoprogenitora $RUNX2^+$, que se diferencia a un preosteoblasto OSX^+ que dará finalmente lugar al osteoblasto funcional (Figura 8). La diferenciación hasta osteoblastos es un proceso en el que está implicado un complejo sistema de activación secuencial en el que intervienen distintos factores de transcripción específicos para cada fase (Narayanan, Srinaath, Rohini, & Selvamurugan, 2019). Entre estos factores de transcripción implicados destacan $RUNX2$ y OSX (Nakashima et al., 2002; Vimalraj, Arumugam, Miranda, & Selvamurugan, 2015). Siendo el más relevante, y esencial aunque no suficiente, para la diferenciación exitosa a osteoblasto $RUNX2$ (Komori, 2018): induce la expresión de los marcadores específicos de osteoblastos colágeno tipo I, ALP, osteocalcina y osteonectina (Vimalraj et al., 2015).

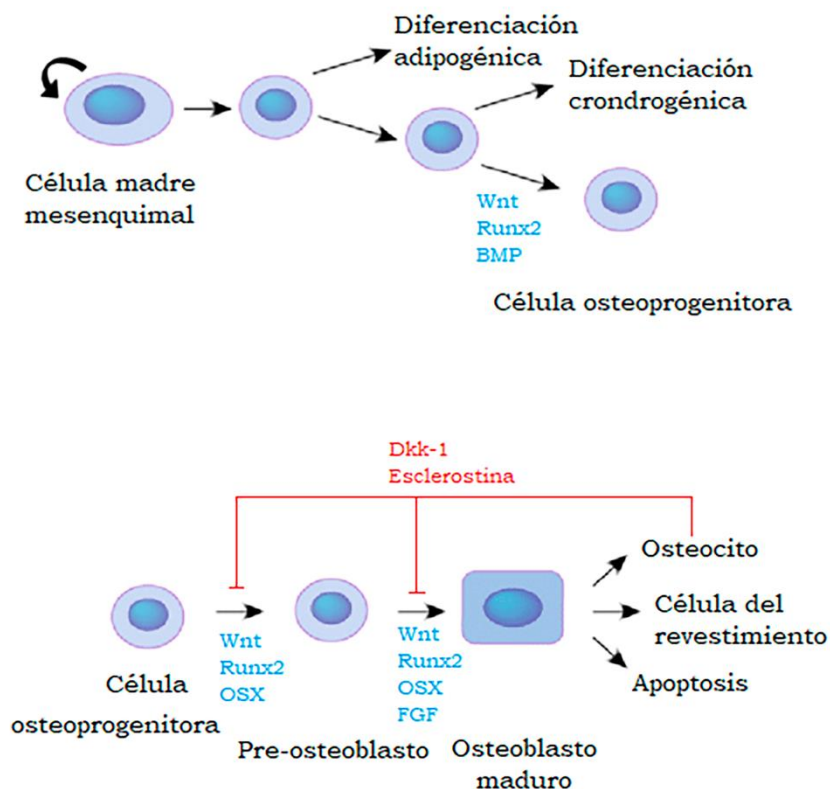


Figura 5. Representación esquemática del proceso de diferenciación al linaje osteogénico a partir de células madre mesenquimales. Se representan las principales moléculas implicadas en el compromiso de linaje y en la modulación de la diferenciación osteogénica. Imagen modificada de (Ng, Mutsaers, Baker, & Walkley, 2012).

Aunque RUNX2 y OSX destaquen en este proceso, no son las únicas moléculas implicadas ya que también intervienen otras proteínas. El orden exacto de participación de cada una no se conoce completamente pero sí está establecido que la IHH únicamente participa en estadios muy iniciales activando la expresión de RUNX2 en células progenitoras (H. Hu et al., 2005) dando como resultado células RUNX2⁺. La segunda molécula en participar sería la Wnt que, en su vía canónica estabiliza a la β -catenina, inhibe la vía condrogénica y dirige a las células progenitoras RUNX2⁺ a la diferenciación osteoblástica (Komori, 2018). Éste no es el único punto del proceso en el que Wnt participa ya que tiene un papel esencial en la diferenciación a osteoblastos de preosteoblastos OSX⁺ (Rodda & McMahon, 2006). NOTCH tiene un doble función en el proceso: (1) inhibe la diferenciación de las MSCs a células osteoprogenitoras a la vez que promueve la proliferación de MSC, manteniendo esta población celular en el tejido (Engin et al., 2008; Hilton et al., 2008) y (2) promueve que los preosteoblastos se diferencien a osteoblastos (Narayanan et al., 2019). Por último, BMP, tras activar una cascada de señalización intracelular, aparece en el proceso como un regulador positivo de la diferenciación osteoblástica (Narayanan et al., 2019; Vimalraj et al., 2015). Este proceso de diferenciación osteoblástica a partir de MSCs procedentes de la médula ósea es inhibido en un proceso claro de retroalimentación negativa por los osteocitos maduros que secretan DKK1 y esclerostina, inhibidores de la vía canónica de la Wnt (Robling & Bonewald, 2020).

Osteoblastos

Son células diferenciadas a partir de células madre mesenquimales (Figura 8), aunque en la literatura reciente se ha descrito que también pueden derivar de células del revestimiento óseo en adultos (Matic et al., 2016). Además, se ha descrito a los condrocitos hipertróficos como una potencial fuente de osteoblastos al evidenciar *in vivo* su capacidad para diferenciarse en osteoblastos (Yang et al., 2014). Aún siendo células diferenciadas, los osteoblastos mantienen la capacidad proliferativa. Morfológicamente son células cuboides, con un único núcleo muy desarrollado polarizado hacia el extremo opuesto de la superficie ósea. Se trata de una célula secretora, y como tal tiene un retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi de gran tamaño, que le permite una rápida síntesis y secreción de los componentes de la matriz ósea sin mineralizar (osteoide) (Liu, Malaval, & Aubin, 1997).

Además de la secreción de colágeno tipo I y las proteínas constituyentes del osteoide, el osteoblasto regula la mineralización de la matriz ósea (Murshed, Harmey, Millán, McKee, & Karsenty, 2005). Entre las principales proteínas secretadas por el osteoblasto se encuentran la osteonectina, osteocalcina, sialoproteínas, osteopontina, proteoglicanos y la fosfatasa alcalina. Esta última proteína es secretada en grandes cantidades por los osteoblastos y es clave para la iniciación de la mineralización (Chatziravdeli, Katsaras, & Lambrou, 2019; Orimo, 2010).

Los osteoblastos participan en el crecimiento y remodelado óseo. Concretamente, la participación de los osteoblastos en el remodelado óseo se inicia cuando los osteoclastos han reabsorbido una determinada zona del tejido. La coordinación en el proceso es resultado de una señalización paracrina que induce su migración a la zona de remodelado. Una vez migrados, los osteoblastos comienzan la síntesis y secreción de la nueva matriz ósea hasta quedar embebidos por completo en ella. A medida que la matriz crece alrededor suyo, los osteoblastos tienen tres destinos: (1) pueden diferenciarse a

osteocitos; (2) inactivarse, convirtiéndose en células de revestimiento óseo o (3) entrar en apoptosis (Manolagas, 2000).

Células de revestimiento

Derivan de osteoblastos que no están implicados en el proceso de remodelado óseo y tapizan el tejido óseo. Se denominan periósticas si recubren superficies externas y endósticas si están localizadas en superficies internas. Entre ellas establecen uniones GAP, que comunican entre sí sus citoplasmas (Miller, de Saint-Georges, Bowman, & Jee, 1989). Debido a que presentan prolongaciones con las que establecen contacto con los osteocitos es posible que estén implicadas en la nutrición y mantenimiento de los osteocitos. A día de hoy la función de estas células no está completamente esclarecida; aunque sí se sabe que tiene un papel importante en la remodelación ósea (Everts et al., 2002).

Osteocitos

Los osteocitos derivan de los osteoblastos que han sido embebidos en su propia matriz. A diferencia de los osteoblastos, carecen de capacidad proliferativa (Schaffler, Cheung, Majeska, & Kennedy, 2014). De los diferentes tipos celulares presentes en el tejido óseo, los osteocitos son, con diferencia, el tipo más abundante (más del 90% de las células presentes en el hueso) y el más longevo, llegando a los 25 años (Franz-Odenaal, Hall, & Witten, 2006). Presentan una morfología estrellada característica, un menor tamaño que los osteoblastos y con un retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi menos desarrollados (Dudley & Spiro, 1961), indicando que su función principal no es secretora. Presentan estructuras dendríticas que se ramifican en canalículos que interconectan a los osteocitos entre sí y además de conectar también con los osteoblastos, las células de revestimiento y las células de la médula ósea, formando una red de comunicación intercelular en el tejido óseo (Bonewald, 2011).

Tienen dos funciones principales. La primera es mecano-sensitiva al transducir señales de carga sobre el hueso generando una respuesta a estas fuerzas mecánicas coordinando la modelación y remodelación ósea mediante la regulación de la actividad osteoclástica y osteoblástica (Bonewald & Johnson, 2008; Dallas, Prideaux, & Bonewald, 2013). En esta función tiene un papel relevante la secreción por parte de los osteocitos de esclerostina y DKK-1 que son antagonistas de la vía Wnt y por lo tanto inhibidoras de la formación de hueso por parte de los osteoblastos (Kamiya et al., 2010). La secreción de estas proteínas se ve limitada por la carga mecánica por lo que el aumento en la carga mecánica resulta en un aumento local de la formación ósea (Moester, Papapoulos, Löwik, & van Bezooijen, 2010). Su otra función es la homeostasis mineral ya que, entre las distintas moléculas que secretan, se encuentra el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) que reduce los niveles de fosfato en suero al inhibir tanto la resorción renal como la activación de la vitamina D que provoca la reducción de la absorción intestinal (Chen, Senda, & Kubo, 2015; J. Q. Feng et al., 2006; Quarles, 2012). Al entrar en apoptosis se aprecia un aumento en la producción de RANKL, una molécula activadora de la función osteoclástica; aunque no está claro si es producida directamente por los osteocitos apoptóticos o si éstos emiten señales a otros osteocitos para que la produzcan (Jilka, Noble, & Weinstein, 2013).

Osteoclastos

Al contrario que el resto de tipos celulares presentes en el tejido óseo, los osteoclastos tienen un origen hematopoyético, en concreto del linaje monocito-macrófago (Teitelbaum & Ross, 2003).

Los osteoclastos son células multinucleadas y de gran tamaño originadas por la fusión de células precursoras. Una vez diferenciados los microfilamentos de actina de su citoesqueleto forman extensiones citoplasmáticas en forma de podosomas, que facilitan la adhesión a la superficie ósea y la formación de la zona de sellado. La zona de sellado posibilita un microambiente aislado en el que el osteoclasto puede disolver y digerir la matriz ósea (Boyle, Simonet, & Lacey, 2003). Este microambiente es altamente ácido y en él se han detectado valores del pH de 4.0 (Silver, Murrills, & Etherington, 1988).

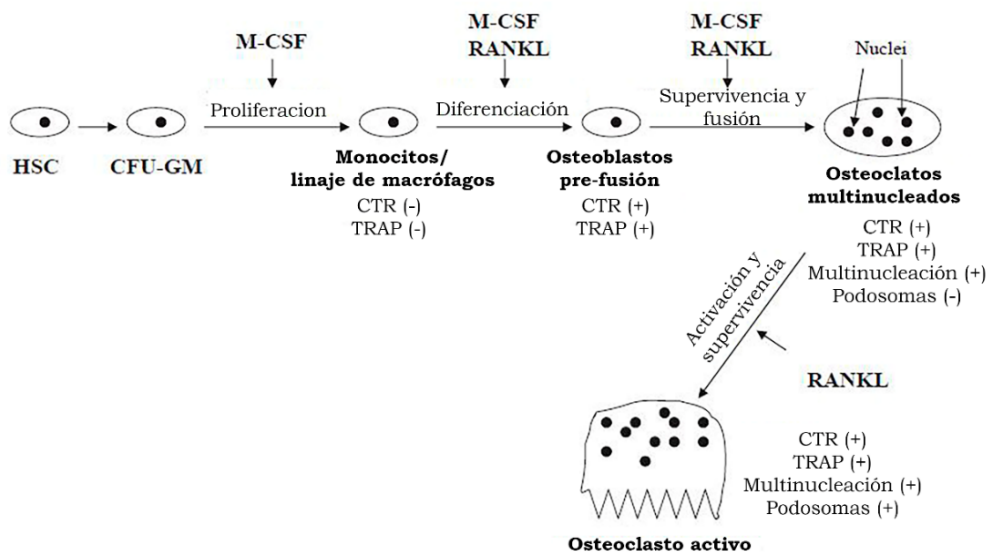


Figura 6. Representación esquemática del proceso de diferenciación a osteoclastos maduros y activos. Están representados los pasos del proceso, así como las moléculas que participan y fenotipo de las células intermedias del proceso. Imagen modificada de (X. Feng, 2005).

El proceso de diferenciación de los osteoblastos consta de varios pasos (Figura 9). Sus dos principales estimuladores, son RANKL y M-CSF (Boyle et al., 2003). Ambas moléculas son expresadas tanto por las células madre mesenquimales como por los osteoblastos. Los osteoblastos igualmente sintetizan moléculas inhibitoras de la osteoclastogénesis como la osteoprotegerina (OPG), proteína inhibidora competitiva que imposibilita la unión RANK-RANKL (Udagawa et al., 2000). Conjuntamente, estos datos evidencian la importancia que tiene la interacción entre osteoblastos y osteoclastos para la correcta función de cada uno de ellos y se pueda dar la secuenciación correcta en sus funciones que posibilita el correcto remodelado óseo.

Una vez totalmente diferenciado, el osteoclasto ya es funcional y puede llevar a cabo su función principal: la resorción del tejido óseo (Figura 10). Para ello presenta cuatro dominios diferenciados (Takito, Inoue, & Nakamura, 2018):

- a. Zona de sellado, unión íntima del osteoclasto con la matriz ósea que genera la laguna de resorción.

- b. Borde rugoso, área del osteoblasto donde se produce la resorción. Presenta una gran cantidad de microvellosidades que aumenta la superficie por la cual secreta enzimas y protones.
- c. Dominio secretor, región apical del osteoblasto por donde se secretan en vesículas sustancias destinadas a la resorción.
- d. Membrana basolateral, región del osteoblasto por la cual los materiales digeridos salen de la célula completando la transcitosis.

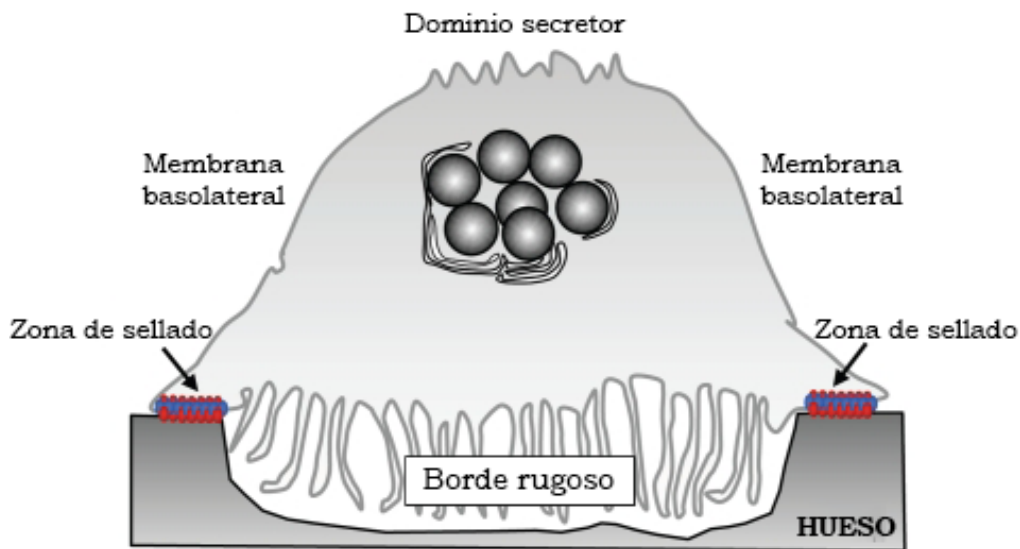


Figura 7. Representación esquemática de la fisionomía de un osteoclasto activo realizando la resorción ósea. Están detallados los dominios característicos del osteoclasto durante la actividad. Imagen modificada de (Itzstein, Coxon, & Rogers, 2011).

La laguna de resorción está caracterizada por un ambiente ácido, esencial para la disolución de la fase mineral (hidroxiapatita) del hueso producida mediante la secreción de ácido clorhídrico. Una vez disuelta la fase mineral, los iones calcio y fosfato son liberados al espacio extracelular mediante transcitosis. La matriz ósea restante colapsa por acción de enzimas proteolíticas; la cathepsina K parece tener un papel principal ya que es secretada en grandes cantidades por el osteoclasto y tiene capacidad de hidrolizar el colágeno tipo I (Ross, 2013). Los osteoclastos también producen metaloproteinasas, principalmente MMP9 y MMP14. Debido a que su inhibición individual no afectaba a la resorción ósea, se les atribuía un papel menos importante pero un estudio recientemente publicado demuestra que la inhibición conjunta de MMP9 y MMP14 paraliza la actividad resorptiva en ratones (Zhu et al., 2020). Una vez comenzada la resorción del tejido óseo, los osteoclastos pasan a tener un tiempo limitado de vida y finalizan entrando en apoptosis (Väänänen & Laitala-Leinonen, 2008).

Clasificaciones de los huesos

Los distintos tipos de huesos que los anatomistas identifican dependen de los criterios en los que se basan. Basándose en la estructura macroscópica, encontramos dos tipos de hueso:

- a. Hueso cortical (compacto), que es denso, sólido y se localiza en la zona externa de la estructura ósea.
- b. Hueso trabecular (esponjoso), es una red de láminas y barras trabeculares interconectadas que rodean la médula ósea, limitándola.

En el esqueleto adulto, aproximadamente un 80% está compuesto por hueso cortical y el restante 20% por hueso trabecular (Kenkre & Bassett, 2018). Estas proporciones son variables en función de la parte del esqueleto se analice (Figura 5); por ejemplo, en las vértebras la estructura dominante es la de trabecular (75% frente al 25% de hueso cortical), la cabeza del fémur está compuesta al 50% de cada tipo de hueso y en la diáfisis del radio el tipo más abundante es el cortical (95% frente al 5% de hueso trabecular). En términos de función metabólica, se considera como más activo al hueso trabecular mientras que al hueso cortical se le atribuye una función mayoritaria mecánica (Parkinson & Fazzalari, 2013). Esta diferenciación no es atribuible a todas las especies de vertebrados ya que, por ejemplo, durante la formación de la cornamenta de los ciervos el aporte mineral necesario proviene del hueso cortical (Banks, Epling, Kainer, & Davis, 1968).

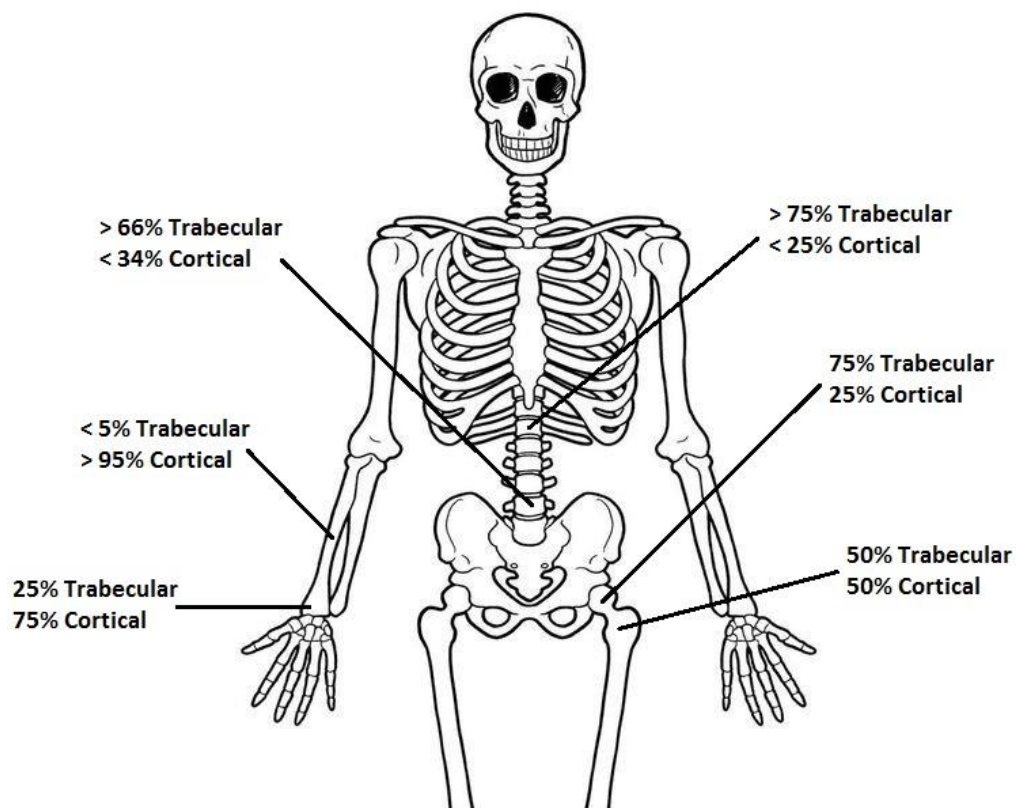
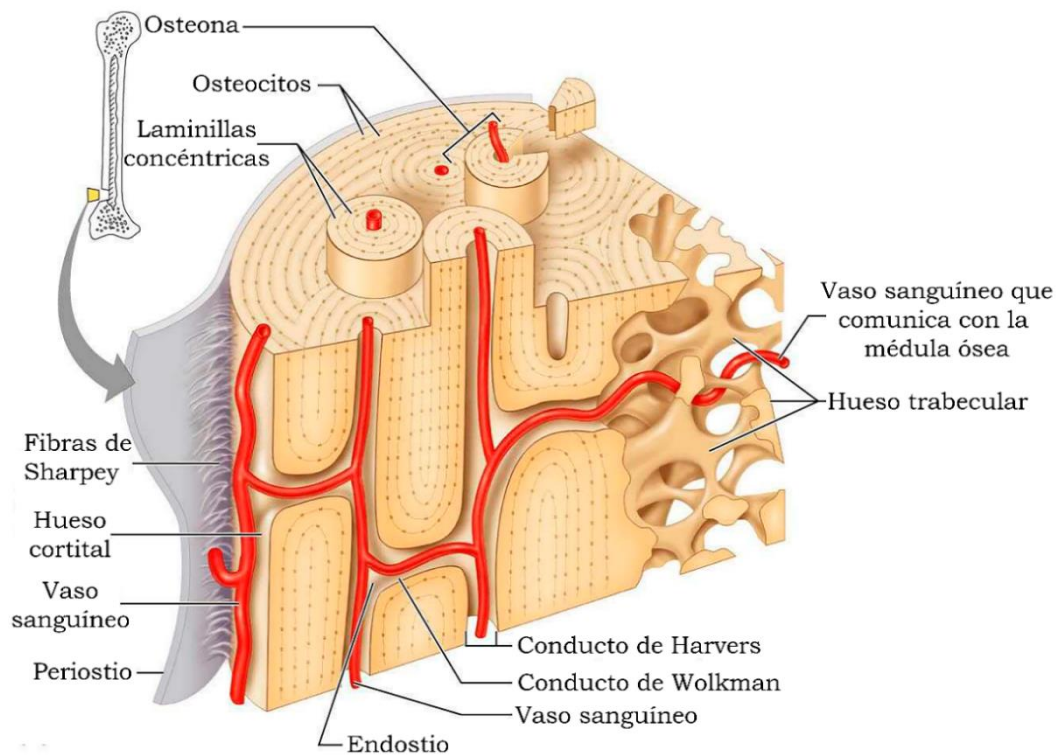


Figura 8. Proporciones de hueso trabecular y hueso cortical que componen el esqueleto humano adulto y la variación de esta composición en las distintas localizaciones anatómicas.

A nivel microscópico ambos tipos de hueso son muy semejantes (Figura 6), estando ambos compuestos por osteonas, unidades estructurales básicas, también denominadas sistemas de Harvers en honor al anatomista inglés Clopton Harvers. Los sistemas de Harvers están formados por laminillas concéntricas alrededor de un conducto central (conducto de Harvers). Las distintas capas de laminillas alternan su orientación para dotar a la estructura de una mayor resistencia. Los conductos de Harvers están comunicados entre sí además de con la cavidad medular y la superficie externa mediante los conductos de Volkmann, que recorren transversalmente el hueso, formándose una red similar a las ramas de un árbol (Stout et al., 1999).



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Figura 9. Esquema detallado de la estructura y composición microscópica del hueso adulto humano.

Existe otra clasificación alternativa para los huesos (Figura 7), basada en su forma, tamaño y función que realizan:

- Hueso plano, como los que forman el cráneo, tienen función protectora de los órganos vitales. Son delgados y anchos y están formados por dos gruesas capas de hueso cortical entre las que se encuentra una de hueso trabecular.
- Hueso largo, como el fémur o la tibia, tienen como función principal dar apoyo a las distintas formas de movimiento que existen en el cuerpo humano. Están formados por una diáfisis y dos epífisis, en ambos extremos, que están cubiertas por cartílago hialino. Uniendo diáfisis con epífisis se encuentra la metáfisis. La lámina de crecimiento del hueso está localizada en la metáfisis y la epífisis. En el interior de la diáfisis se encuentra una cavidad en la que se aloja la médula que está recubierta por hueso cortical. El resto de la diáfisis está compuesto por hueso cortical. En las epífisis se invierte la presencia de los huesos, siendo mayoritario el hueso trabecular.

- c. Hueso corto, como los que forman en carpo o la rótula, tienen la forma aproximada de un cubo. Comparten la función con los huesos largos (apoyo a la locomoción) y contienen en su mayoría hueso trabecular con una capa delgada de hueso compacto en la superficie. Al encontrarse principalmente en articulaciones están rodeados por cartílago hialino.
- d. Hueso irregular, como las vértebras y los huesos neumáticos, es aquel que debido a la forma que presenta no encaja en ninguna de las categorías anteriores.

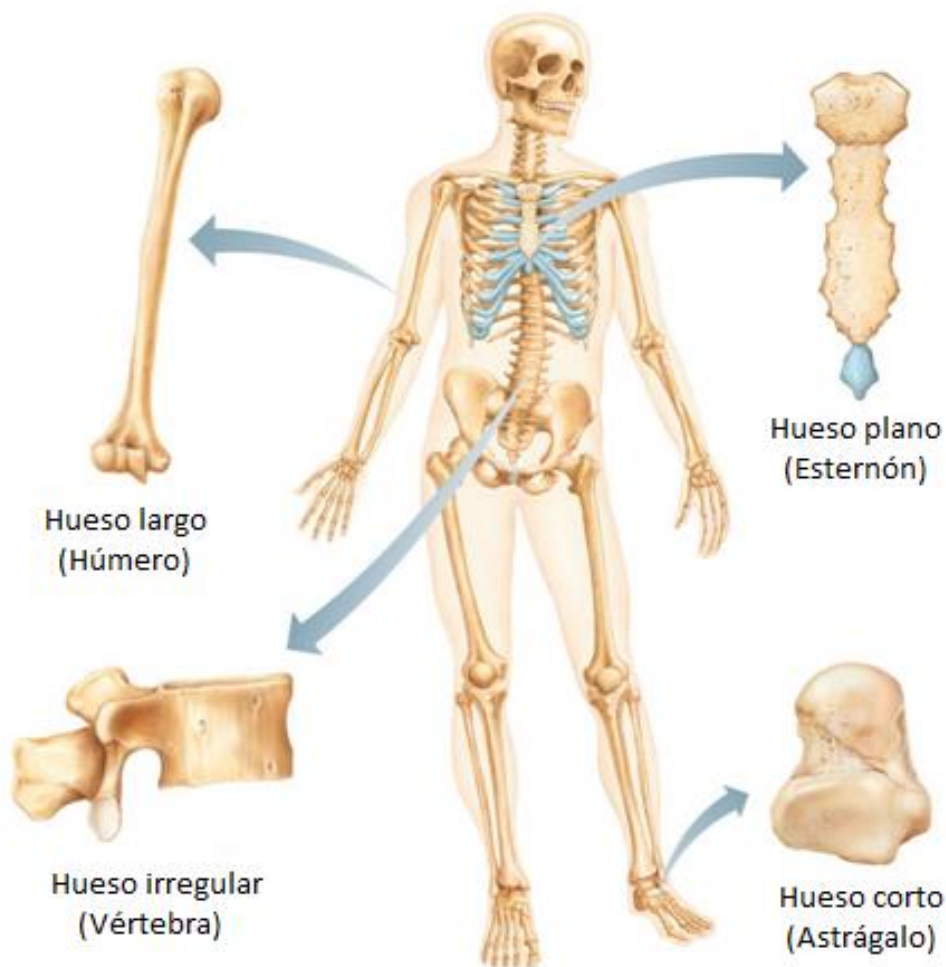


Figura 10. Clasificación de los distintos tipos de huesos que componen el esqueleto según su forma y su localización en el esqueleto humano adulto.

Biomateriales

Un biomaterial es un artefacto diseñado con una forma específica que, solo o formando parte de un sistema, tiene como función el dirigir un procedimiento terapéutico o diagnóstico (Williams, 2009). Basándonos en la composición de los biomateriales, quedarían divididos en los siguientes grupos:

Metálicos

Los materiales metálicos han sido usados con fines terapéuticos desde antiguas civilizaciones como la romana o griegos. En la actualidad, su uso mayoritario es en forma de implantes que sustituyen la función de órganos dañados. La corrosión es el mayor problema que presenta este grupo de biomaterial ya que se liberan al medio iones que alteran la homeostasis y funcionamiento celular. El acero inoxidable, resistente a la corrosión, supuso un gran avance y es el compuesto de la mayoría de implantes metálicos que se usan en la actualidad debido al gran ratio costo/efecto que presenta (Bekmurzayeva, Duncanson, Azevedo, & Kanayeva, 2018). También son ampliamente empleados para implantes el titanio y la aleación Cr-Co-Mo; según los requerimientos específicos (fuerzas que actuarán o limitaciones de diseño, entre otros) que tenga que cumplir el implante se usará uno u otro (Bekmurzayeva et al., 2018). Junto con una posible respuesta adversa, el principal riesgo que tiene este tipo de biomaterial es el de sufrir una fractura ya sea por mal diseño o por fatiga excesiva.

Polímeros sintéticos

El número de polímeros existentes es muy elevado. Las propiedades físicas que presenten estos biomateriales van a depender de la composición química que tengan, el grado de entrecruzamiento que presenten y la presencia o ausencia de aditivos. Según la rigidez que presenten, se dividen en dos grupos: (a) elastómeros, capaces de volver a su forma original tras ser sometidos a deformaciones y (b) plásticos, son rígidos y carentes de elasticidad. Entre las aplicaciones terapéuticas encontramos: lentes de contacto, fijación de prótesis, adhesivos tisulares o liberación de fármacos (Hoffman, 2002; McKeen, 2019; Rokaya et al., 2018).

De origen biológico

Entre los diferentes y variados biomateriales naturales que existen destaca el colágeno. Debido a las características físicas (alta fuerza tensil), químicas (capacidad de formar enlaces de entrecruzamiento e interacción con moléculas) como biológicas (baja capacidad de producir una respuesta inmune) que presenta es el biomaterial natural más utilizado con múltiples aplicaciones: sustitución de córnea, piel artificial o componente de vasos y válvulas cardíacas (Felician, Xia, Qi, & Xu, 2018). En un contexto de regeneración ósea se emplean corales (cerámica natural) debido a que su arquitectura es muy similar a la que presenta el hueso esponjoso o trabecular (Pountos & Giannoudis, 2016).

Basados en estructuras de carbono

Estos materiales se caracterizan por presentar propiedades físicas y químicas muy diversas. Esto es consecuencia de la gran variabilidad estructural que presentan al tratarse de alótropos de carbono. Un alótropo es cada una de las distintas estructuras moleculares que están formadas por un único elemento; en este caso, el carbono. En la naturaleza encontramos dos alótropos del carbono que son un claro ejemplo de la influencia que tiene la estructura molecular: (1) grafito, cuya estructura es un hexágono plano de átomos de carbono y (2) diamante, que presenta una estructura en forma tetraédrica. En los últimos años se han descubierto nuevos

alótropos de carbono, siendo el grupo más recientemente descubierto y el que más interés ha despertado, por sus potenciales aplicaciones tanto científicas como biosanitarias, el grafeno (Foo & Gopinath, 2017).

El grafeno está compuesto por una única capa de átomos de carbono dispuestos de manera hexagonal. De manera muy simplificada, se trata de una de las capas que forman la estructura del grafito por lo que para su obtención hay que realizar una exfoliación al grafito. El método para lograrlo fue descrito en 2004 (Novoselov et al., 2004) y desde entonces ha acaparado atención de investigadores de distintas disciplinas científicas. Su importancia y repercusión en el ámbito científico ha sido tan grande que los autores del método para su aislamiento fueron premiados con el Nobel de Física en 2010.

Cerámicas

Una cerámica es aquel material inorgánico sintetizado, sólido, cristalino y estable químicamente, quedando excluidos los metales. Las cerámicas empleadas como biomateriales con un fin clínico (rellenar defectos óseos, prótesis óseas, reemplazar tejido dañado...) reciben el nombre de biocerámicas (Yamamuro, 2004).

Si se tiene en cuenta su interacción con el hueso, hay tres tipos: (1) Bioinertes; (2) Bioactivas; y (3) Bioreabsorbibles. Las cerámicas bioinertes presentan una gran estabilidad química y resistencia mecánica *in vivo*; una vez implantadas en el hueso no interactúan con él (Yamamuro, 2004). Un ejemplo de este grupo sería la zirconia, muy empleada en implantes dentales por sus propiedades (Cionca, Hashim, & Mombelli, 2017). Las cerámicas bioactivas tienen una resistencia mecánica inferior a las bioinertes pero, en cambio, interactúan con el hueso y permiten tanto la osteoinducción (adhesión y diferenciación celular a linaje osteogénico) como la osteointegración (unión química con el hueso) una vez implantadas (Yamamuro, 2004), siendo empleados en procesos de reparación y formación periodontal (Arcos & Vallet-Regí, 2013). Por último, las cerámicas bioreabsorbibles son solubles y pueden ser absorbidas gradualmente hasta ser reemplazadas en su totalidad por el hueso formado. Por ello son usadas cuando se requiere que en menos de 6 meses estén reabsorbidas, como defectos periodontales (Yamamuro, 2004).

Según la composición química que presenten las biocerámicas se dividen en dos grandes bloques: (1) Fosfatos de Calcio (CaP) y (2) Otros, entre los que se incluyen la zirconia, la alúmina y los vidrios (Tanaka & Yamashita, 2008). Los CaPs son empleados en medicina y odontología desde hace varias décadas para implantes dentales y cirugías maxilofaciales, entre otras aplicaciones. El ratio Ca:P determina la solubilidad de la biocerámica y, por lo tanto, su velocidad de reabsorción: a menor ratio, mayor solubilidad y más rápido es reabsorbida *in vivo* (Descamps et al., 2013). Los CaPs son biocompatibles, osteoconductores y osteoinductores; debido a estas propiedades son considerados como *scaffolds* en contextos de regeneración ósea. En este sentido, la hidroxiapatita (HA) y el beta-fosfato tricálcico (β -TCP) son los CaPs que más atención han recibido (Wagoner Johnson & Herschler, 2011) y por ello han sido los empleados en los experimentos *in vitro* realizados en esta tesis.

Hidroxiapatita (HA)

La HA presenta una composición específica ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que le confiere un ratio Ca:P de 1,67, traducible en una velocidad de absorción baja. Adicionalmente, la HA muestra una resistencia a la fractura y fatiga relativamente baja. Estas propiedades mecánicas difieren según las condiciones de preparación de la cerámica; un ejemplo claro es la influencia de la temperatura de sinterización (compactación de una mezcla

homogénea a alta presión y sujeta a un tratamiento térmico con temperaturas inferiores a la temperatura de fusión de la mezcla). Así, en el caso de la HA la resistencia mecánica aumenta si es sinterizada entre 1100 y 1150°C; no se aprecian diferencias en el rango de 1150-1250°C y disminuye cuando la temperatura de sinterización es superior a los 1250°C (Legeros & Legeros, 2008).

La HA biológica (de forma natural) constituye la fase inorgánica de estructuras calcificadas del cuerpo (dientes y huesos) y está presente en calcificaciones patológicas como las piedras renales. La HA biológica posee distintas sustituciones que la hacen diferir de la HA sintética/mineral, la cual no posee estas sustituciones. Aun así, la similitud es muy alta entre ambas HAs tanto en composición como estructura. Debido a estas similitudes, se comenzaron a estudiar como biomateriales para regeneración ósea a finales de la década de 1970 como alternativa más barata y segura a los auto y aloinjertos (Legeros & Legeros, 2008). Hoy en día, además de en reparación y regeneración ósea, son usados en áreas no relacionadas con la práctica clínica como la cromatografía de proteínas o defluoración del agua (Kawasaki, 1991; Medellín-Castillo et al., 2007).

Las propiedades biológicas de la HA han sido probadas con diferentes tipos celulares presentes en el tejido óseo y periodontal (osteoblastos, osteoclastos, odontoblastos y células del ligamento periodontal) confirmando la adhesión, proliferación, diferenciación y expresión de marcadores fenotípicos (Inoue et al., 2004). También se ha comprobado que la HA es un biomaterial bioactivo, tiene capacidad de unirse al hueso mediante interacciones químicas en vez de físicas o mecánicas, y que presenta tanto propiedades osteoconductoras (permiten la adhesión, proliferación y diferenciación al linaje osteogénico y sirven como plantilla para la formación del nuevo tejido óseo en su superficie) como osteoinductoras (favorecen la formación *de novo* de tejido óseo) (Cheng et al., 2010; Legeros & Legeros, 2008; Redondo, García Cantera, Hernández, & Puerta, 1995).

Estas propiedades físicas y biológica han provocado que la HA tenga aplicaciones clínicas en una amplia variedad de circunstancias: taponamiento de pulpa dental, aumento de la cresta alveolar, reconstrucción de maxilares, elevación de senos sinusales, defectos periodontales, reparación de defectos óseos, aumento de barbilla u osteotomía tibial son algunos ejemplos (Aragon & Bohay, 2005; El Deeb, Tompach, Morstad, & Kwon, 1991; Frank, Wiedemann, Hemmerle, & Freymann, 1991; Heise, Osborn, & Duwe, 1990; Knychalska-Karwan, Kaczmarczyk-Stachowska, Slosarczyk, Stobierska, & Paszkiewicz, 1997; Kobayashi, Shingaki, Nakajima, & Hanada, 1993; Koshino, Murase, Takagi, & Saito, 2001; Peltola, Aitasalo, Suonpää, Yli-Urpo, & Laippala, 2001).

Beta-Fosfato Tricálcico (β -TCP)

Los fosfato tricálcico (TCP) son una familia de CaPs entre los más usados en implantes, la podemos encontrar en sustitutos óseos cerámicos, recubriendo prótesis metálicas, cementos y en composites. El miembro más ampliamente usado es el β -TCP que presenta una estructura cristalina que le hace estable en un amplio rango de temperatura: desde la temperatura ambiente hasta sobrepasar los 1000°C. En comparación con la HA, el β -TCP es más soluble, más fácilmente degradable y posibilita su reemplazo por hueso recién formado después de su implantación. Aunque esta mayor solubilidad puede suponer un hándicap ya que dificulta el equilibrio necesario

entre la velocidad a la que el material es reabsorbido y el nuevo hueso es formado (Rey, Combes, Drouet, & Somrani, 2008). Eso no ha impedido que el β -TCP sea comercializado y que a día de hoy sea empleado como unos de los principales sustitutos óseos por cirujanos y dentistas en el tratamiento de variedad de defectos óseos: aumento de la cresta alveolar después de extracciones dentales, reconstrucción del hueso después de lesión traumática o corrección de diversas deformidades (Nakagawa, Saegusa, Abe, Miura, & Yoshiya, 2006; Ogose et al., 2005).

En lo referente a sus propiedades biológicas, se han cultivado en este material osteoblastos, osteoclastos y células de la médula ósea, obteniendo resultados que lo describen como un material no tóxico que permite la adhesión, proliferación y diferenciación celular posibilitando la generación de tejido óseo en localizaciones no óseas (Rey et al., 2008).

Independientemente de la CaP empleada en su fabricación, los *scaffolds* ideales en el contexto de regeneración ósea deben cumplir muchos requisitos de diseño (Porter, Ruckh, & Popat, 2009):

- Proporcionar soporte mecánico temporal.
- Favorecer el depósito del material osteoide.
- Presentar una arquitectura porosa para que la vascularización y el crecimiento óseo pueda tener lugar.
- Promover la migración celular ósea en él.
- Fomentar la osteoinducción.
- Estimular la mejora de la osteointegración celular.
- Promover la actividad hacia la integración del tejido *scaffold*-huésped.
- Control de la capacidad de degradación para favorecer la transferencia de carga al nuevo hueso formado.
- Generar productos de degradación biocompatibles.
- Evitar cualquier tipo de respuesta inflamatoria.
- Presentar una fácil esterilización.
- Ser capaz de liberar moléculas y/o drogas bioactivas.
- Acelerar la curación y/o prevenir cualquier tipo de patología.

Células Madre

El desarrollo genérico de una célula consta, a grandes rasgos, de la secuencia de eventos programados: proliferación, compromiso de linaje, inhibición celular y apoptosis regulada. Esta cadena de eventos da como resultado la formación de células, tejidos y órganos diferenciados (Young & Black, 2004). No todas las células completan esta secuencia, convirtiéndose de este modo en células precursoras que participan en el mantenimiento y reparación de tejidos (Young et al., 2004). Estas células de reserva son las células madre (Figura 11).

Las células madre están presentes en todos los organismos pluricelulares durante todas las etapas de la vida y se definen por ser células indiferenciadas, clonogénicas, con capacidad para autorenovarse durante toda su vida y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas de distintos linajes (Kuci et al., 2009). Debido a estas características, las células madre tienen una importancia capital en los procesos de regeneración o reparación en los tejidos y es por ello que se les considera como una herramienta muy valiosa para distintas aplicaciones médicas (Chien, 2008).

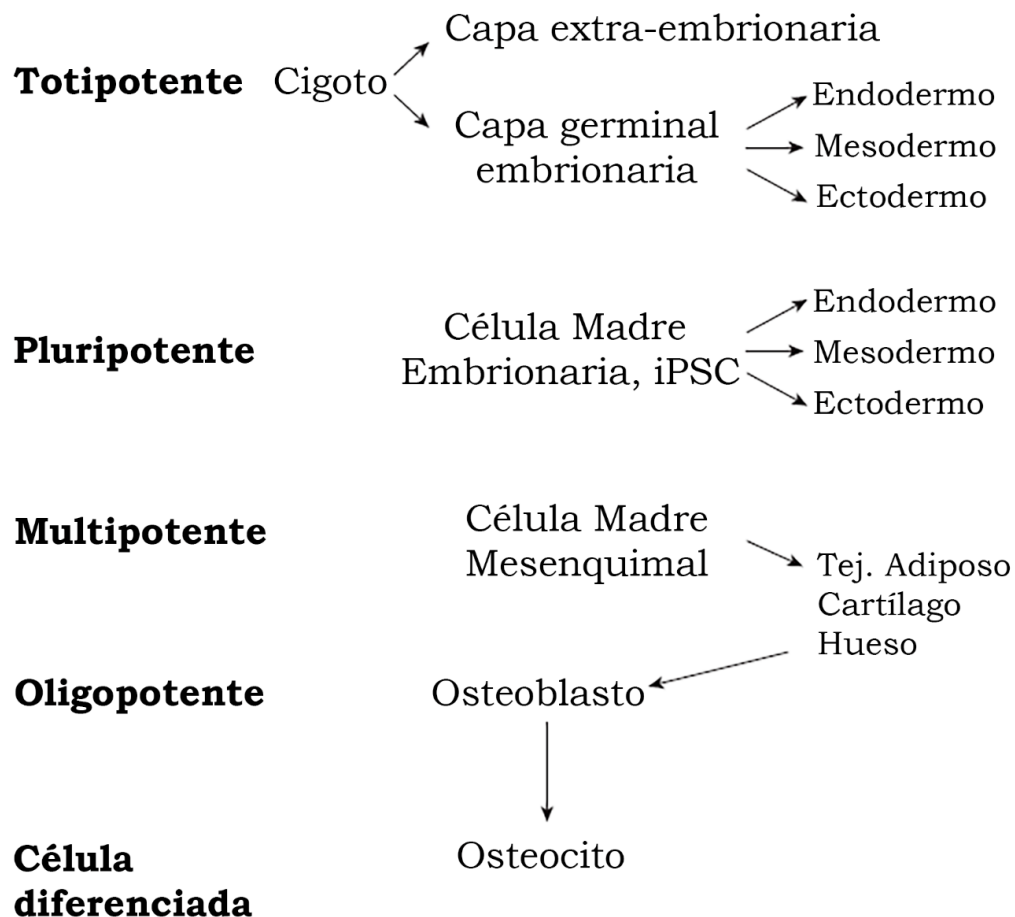


Figura 11. Clasificación de las células madre según su potencial de diferenciación. Las células totipotentes forman tejido embrionario y extraembrionario. Las células pluripotentes forman las 3 capas germinales, mientras que las células multipotentes generan células limitadas a una capa germinal. Para cada grupo hay un ejemplo celular.

Las células madre pueden clasificarse en base a dos criterios: su potencial de diferenciación o por su origen. De acuerdo con su mayor a menor potencial de diferenciación, se distinguen cinco grupos:

Células Totipotentes

Se encuentran en etapas muy iniciales del desarrollo, siendo las células menos diferenciadas que hay y por lo tanto las que más potencia celular presentan como ocurre con los cigotos (Condic, 2014). Son las únicas que tienen la capacidad de diferenciarse en los todos linajes, tanto embrionarios como extraembrionarios (Rossant, 2001) lo que les confiere la capacidad de generar un organismo completo y funcional.

Células Pluripotentes

Se considera a una célula pluripotente cuando ésta puede dar lugar a las 3 capas germinales pero no a estructuras extraembrionarias (Zakrzewski, Dobrzyński, Szymonowicz, & Rybak, 2019) a partir de las cuales se desarrollan todos los tejidos y órganos (De Miguel, Fuentes-Julián, & Alcaína, 2010). Las células madres embrionarias (ESC) encajan en esta definición y fueron aisladas por primera vez de la masa celular interna del blastocitos en modelos murinos (Evans & Kaufman, 1981). Más recientemente, se ha logrado reprogramar fibroblastos, células somáticas, obteniendo a partir de ellos células pluripotentes (iPSC) tanto de ratones como humanos (Takahashi et al., 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006); descubrimiento que fue premiado con el Nobel de Medicina en 2012.

Células Multipotentes

Son células multipotentes aquellas que se pueden diferenciar a los tipos celulares de una capa germinal (M. Ratajczak et al., 2012). Las Células Madre Mesenquimales (MSCs) son el ejemplo más característico de célula multipotente: se pueden aislar de una gran variedad de tejidos, presentan adherencia a plásticos de cultivo, perfil característico de marcadores de membrana y se pueden diferenciar en tejidos mesodérmicos (Almalki & Agrawal, 2016). Además, se ha descrito su diferenciación a linajes celulares de las otras dos capas germinales como el linaje neuronal que deriva del ectodermo siendo un ejemplo de transdiferenciación (Barzilay, Melamed, & Offen, 2009).

Células Oligopotentes

Estas células tienen potencia para autorenovarse y diferenciarse, mínimo, en dos tipos linajes que pertenezcan a un mismo tejido. El ejemplo clásico son las células madre hematopoyéticas ya que se pueden diferenciar tanto al linaje mieloide (basófilos, células dendríticas, eosinófilos, eritrocitos, macrófagos, megacariocitos, monocitos, neutrófilos y plaquetas) como al linaje linfoide (células B, células T y células NK) (Marone et al., 2002).

Células Unipotentes

Son las células madre menos potentes, sólo tienen capacidad para la autorenovación y diferenciarse a un único linaje celular. Un ejemplo serían las células madre musculares que sólo pueden diferenciarse a mioblastos que dan lugar a los miocitos (Mashinchian, Pisconti, Le Moal, & Bentzinger, 2018).

En función de su origen, las células madre se encuadran en uno de los cuatro grupos siguientes:

Células Madre Embrionales (ESC)

Son células madre que se aíslan de la masa celular interna de los blastocitos en los 5-6 días posteriores a la fertilización (Figura 12). Una vez aisladas del blastocito y bajo condiciones de cultivo muy específicas, se obtienen líneas de ESCs (Bongso, 2006). Las ESCs son células madre pluripotentes que pueden generar todos los linajes pertenecientes a cualquiera de las 3 capas germinales y, curiosamente, pueden mantenerse en un estado indiferenciado durante largos periodos de tiempo en condiciones de cultivo específicas (Yao et al., 2006) con el añadido de soportar ciclos de congelación y descongelación sin que sus propiedades se vean alteradas (Baharvand et al., 2004). La identificación positiva de ESC se basa en la presencia de los factores de transcripción Nanog y Oct-4, responsables del mantenimiento del estado de indiferenciación (Hambiliki, Ström, Zhang, & Stavreus-Evers, 2012; Z. Wang, Oron, Nelson, Razis, & Ivanova, 2012).

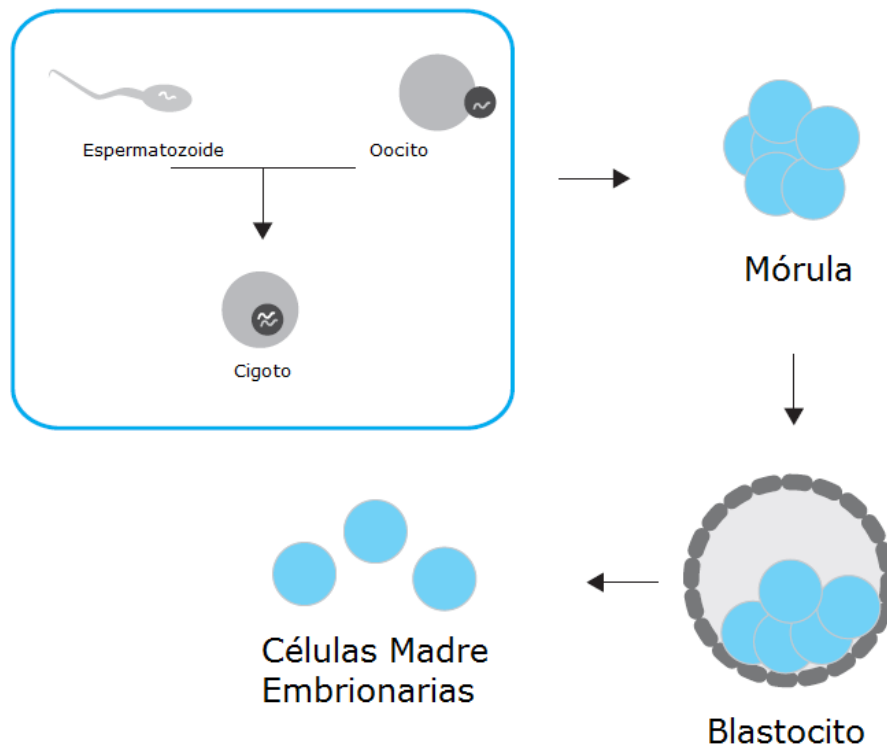


Figura 12. Esquema del protocolo resumido para el aislamiento de células madre embrionarias a partir de cigoto. Imagen modificada de (M. Z. Ratajczak et al., 2014).

Células Madre Adultas

Se trata de células madre que se encuentran en tejidos adultos. Como tales, su aplicación terapéutica, no está sujeta a las consideraciones éticas ligadas al uso de células embrionarias. Adicionalmente, su aplicación, en el caso de ser autóloga, evita los posibles efectos inmunitarios (Körbling & Estrov, 2003; Veiga, Aran, Raya, Messinis, & Mahmood, 2020). En esta categoría se encuentran las MSCs y también las células madre

derivadas de la placenta. Aunque presentan una potencia inferior comparada con las ESCs, tienen capacidad para diferenciarse *in vitro* en los linajes celulares de las capas germinales (Ilancheran, Moodley, & Manuelpillai, 2009; Suman, Domingues, Ratajczak, & Ratajczak, 2019).

Células Madre *Tissue-Resident*

La existencia de estas células otorga a los tejidos la habilidad reparar daños que sufran y renovarse ya que estas células madre dan lugar a células diferenciadas específicas de tejido (Passier, 2003). Se localizan en un microambiente específico caracterizado por señales extracelulares y mediadores solubles que regulan las diferentes funciones de las células y su estado de quiescencia (Yeung, Chia, Kosinski, & Kuo, 2011). Por tanto, este microambiente juega un papel crítico en el mantenimiento de poblaciones de estas células madre y recibe el nombre de “nicho de células madre” (Scadden, 2014).

Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPSC)

Estas células madre son producidas *in vitro* a partir de células somáticas a las que se les induce la expresión de unos factores concretos y, como consecuencia de esta expresión, las células somáticas retornan a un estado de pluripotencia. La primera comunicación de éxito en este procedimiento fue en 2006 tras inducir la expresión de Oct-4, Sox2, Klf4 y c-Myc en fibroblastos de ratones (Takahashi & Yamanaka, 2006). Este mismo grupo publicó un año después el éxito de este protocolo en la obtención de iPSCs a partir de fibroblastos humanos (Takahashi et al., 2007). Casi simultáneamente, con un escaso mes de diferencia a esta comunicación, un grupo americano publicó también la obtención de iPSCs a partir de fibroblastos humanos con la expresión inducida de distintos factores: Oct-4, Sox2, Nanog y Lin28 (Yu et al., 2007). En ambos casos, las iPSCs obtenidas tras la programación expresaron marcadores de membrana y morfología característicos de las ESCs, cariotipo sin ninguna anomalía, actividad de la telomerasa y la potencia para diferenciarse en los linajes celulares de las 3 capas germinales.

En los últimos años se han desarrollado protocolos para obtener iPSCs de una gran variedad de fuentes celulares como, por ejemplo, folículos pilosos o células mononucleares de sangre periférica (Hayashi, Ohnuma, & Furue, 2019). Pese a lo prometedoras que son, las iPSCs tienen que ser analizadas cuidadosamente para su uso terapéutico en humanos debido a los riesgos que conlleva: se ha demostrado que los vectores retrovirales y el factor c-Myc empleados en la reprogramación pueden producir cáncer (Ebben, Zorniak, Clark, & Kuo, 2011); la posible inestabilidad genética que presentan tiene que ser controlada ya que puede traducirse en la formación de tumores, en este sentido ya ha sido descrita la formación espontánea de teratomas (Cunningham, Ulbright, Pera, & Looijenga, 2012). En los últimos años los esfuerzos de los investigadores se ha centrado en lograr avances destinados a aumentar la bioseguridad de las iPSCs previamente a la estandarización de su uso en las técnicas de terapia regenerativa (Yan, Shi, & Huang, 2017).

Las propiedades intrínsecas de las células madre les confiere un papel muy importante en la investigación sanitaria: pueden ser empleadas para el estudio de los mecanismos patogenéticos y patofisiológico de distintas enfermedades, ampliando su conocimiento y entendimiento, o también pueden ser utilizadas en el desarrollo de modelos biológicos para el estudio de nuevos fármacos (Atiya, Frisbie, Pressimone, & Coffman, 2020; Hufnagel, Li, Cosar, Krikun, & Taylor,

2015; Yeo et al., 2013); sin embargo el mayor interés es su aplicación en medicina regenerativa debido a su capacidad de reemplazar tejidos dañados o incluso generar órganos. Como muestra de este interés, en los últimos años las células madre han sido empleadas en estrategias terapéuticas alternativas para revertir el daño sufrido en retina, miocardio o enfermedades neurodegenerativas, entre otras condiciones (Doppler, Deutsch, Lange, & Krane, 2013; Martínez-Morales et al., 2013; Salibian, Widgerow, Abrouk, & Evans, 2013; Tibbetts, Samuel, Chang, & Ho, 2012).

Aunque en un principio pueda parecer que las células madre ideales para ser usadas con un fin terapéutico son las células madre totipotentes, la realidad es que esta totipotencialidad puede resultar contraproducente debido a su elevada capacidad proliferativa como los casos de formación ectópica de teratomas mencionados con anterioridad. Estos riesgos frenaron las altas expectativas que se generaron en torno a las iPSCs, las cuales fueron consideradas como la célula madre óptima (Kuci et al., 2009). Debido a ello, actualmente, es más razonable que la propuesta terapéutica esté basada en el empleo de células madre con una potencia más limitada a las líneas celulares de una capa germinal concreta. Tampoco hay obviar la importancia e injerencia que tiene la ética en la ciencia, produciendo dilemas morales o rechazos desde diferentes ámbitos sociales, que por ejemplo en el caso de las ESCs conllevaría irremediablemente a la destrucción de un embrión.

En este contexto, emergen como células madre ideales a ser empleadas en terapias de medicina regenerativa las MSCs ya que solventan los dos principales hándicaps tanto de las ESCs como de las iPSCs. Las MSCs son células madre adultas que derivan del mesodermo, capa germinal de la que derivan los tejidos conectivos adultos, pudiéndose diferenciar, entre otros tipos celulares, en linajes mesenquimales (cartílago, hueso, tendones, músculos y adipocitos) manteniendo su capacidad de autorenovación (Pittenger et al., 1999). Están consideradas como ubicuas en el organismo (da Silva Meirelles, Chagastelles, & Nardi, 2006) y se ha descrito que su presencia disminuye con la edad (Raggi & Berardi, 2012). También se ha comprobado que presentan capacidad migratoria y potencial inmunomodulador (Castro-Manreza & Montesinos, 2015; Law & Chaudhuri, 2013); esta capacidad inmunomoduladora de las MSCs las hace aún más interesantes ya que amplía su potencial uso más allá de la medicina regenerativa siendo posible su uso terapéutico en condiciones autoinmunes o en las que está afectado el sistema inmune. Aunque las cualidades descritas son compartidas por las MSCs aisladas de diferentes tejidos del organismo y presentan características fenotípicas similares, se ha comprobado que existen diferencias en el potencial para desarrollarlas dependiendo de cuál sea el tejido de origen (Escacena, Quesada-Hernández, Capilla-Gonzalez, Soria, & Hmadcha, 2015). Esta variabilidad posiblemente sea debida a que las MSCs son una población celular heterogénea. De hecho, con el fin de uniformar la caracterización de las MSCs, a falta de un marcador específico y común a todas ellas, y facilitar así el intercambio de información entre los grupos investigadores, la Sociedad Internacional de Terapia Celular estipuló los criterios mínimos para definir a una célula como MSC (Dominici et al., 2006).

Las MSCs de médula ósea (BM-MSCs) fueron el primer tipo de MSC descrito (Friedenstein, Chailakhjan, & Lalykina, 1970) y por lo tanto pioneras en el estudio de las MSCs y sus propiedades; debido a ello a menudo son consideradas como el *gold-standard* de las MSCs (Hass, Kasper, Böhm, & Jacobs, 2011). El método más empleado para la obtención de una muestra médula ósea es un aspirado de la cresta ilíaca y está considerado como mínimamente invasivo (Pountos, Georgouli, Kontakis, & Giannoudis, 2010). Además de su capacidad para diferenciarse en los 3 linajes que las definen como MSCs (osteogénico, adipogénico y

condrogénico) se ha comprobado que, bajo diferentes estímulos, las BM-MSCs tienen capacidad para transdiferenciarse en cardiomiocitos, neuronas o hepatocitos (Choong, Mok, Cheong, Leong, & Then, 2007; Kopen, Prockop, & Phinney, 1999; Lough et al., 1996; Sato et al., 2005; Trzaska, Kuzhikandathil, & Rameshwar, 2007; J. S. Wang et al., 2000; Yoon, Shim, Ro, & Lim, 2005). Una vez demostrada esta gran plasticidad por parte de las BM-MSCs, la comunidad científica las consideró como una prometedora herramienta y se llevaron a cabo múltiples ensayos clínicos para probar su aplicabilidad clínica (Giordano, Galderisi, & Marino, 2007).

Las MSCs derivadas de tejido adiposo (ASCs) presentan las características típicas de las MSCs y presentan ventajas respecto a MSCs aisladas de otras fuentes. Una de las principales ventajas es que los depósitos adiposos se encuentran a lo largo del cuerpo, siendo fácilmente accesibles y la muestra es de mayor tamaño siendo obtenida mediante un método menos invasivo en comparación con las BM-MSCs (Mazini, Rochette, Admou, Amal, & Malka, 2020). Teóricamente, las ASCs no son exclusivas del tejido adiposo blanco sino que estarían también presentes en el tejido adiposo pardo; debido a que el tejido adiposo pardo se encuentra en mayor cantidad en infantes y según la edad avanza su presencia va disminuyendo hasta ser residual en adultos no es considerada una fuente realista de ASCs en individuos adultos (Gathier, Türktaş, & Duckers, 2016). Además, el tejido adiposo tiene una alta densidad de células madre por lo que se obtiene un gran número de ellas (Baer & Geiger, 2012). Esto junto con la gran cantidad de liposucciones que se realizan en los países occidentales, en las que el volumen de tejido adiposo extraído de rutina es desechado, despertaron un temprano interés por el uso de las ASCs en medicina regenerativa (Gimble, Katz, & Bunnell, 2007). En comparación con las BM-MSCs, las ASCs tienen una mayor tasa proliferativa y mantienen su potencia de diferenciación a linajes mesodérmicos a lo largo del envejecimiento (McIntosh, 2011; Puissant et al., 2005). Recientemente ha acaparado interés el hecho de que las ASCs son capaces de secretar un secretoma rico en factores trópicos como citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas que otorgan a las ASCs una función paracrina (Choi et al., 2018; Ferreira & Gomes, 2018; S. Ren et al., 2019), abriendo la posibilidad de una aplicación terapéutica *cell-free* (Kucharzewski et al., 2019; Lombardi et al., 2019).

En los últimos años ha acaparado atención e interés por parte de la medicina regenerativa la pulpa dental ya que se trata de una fuente no invasiva de células madre (DP-MSCs). La principal función de las DP-MSCs es el mantenimiento y reparación del tejido periodontal (Hollands, Aboyaji, & Orcharton, 2018), estando sus propiedades directamente relacionadas con la edad (Nakamura et al., 2009). Gronthos *et al* describieron por primera vez un método de aislamiento para DPSCs (Gronthos, Mankani, Brahimi, Robey, & Shi, 2000); en la actualidad, mayoritariamente son aisladas tras una extracción quirúrgica del tercer molar aunque también pueden serlo de dientes de leche desprendido de manera natural (Racz et al., 2014). Por lo tanto, al igual que en el caso de las ASCs, las DP-MSCs son aisladas de tejidos considerados residuos, habitualmente desechados. Entre las ventajas que las DP-MSCs presentan están su mayor capacidad proliferativa y su fácil diferenciación en odontoblastos, osteoblastos y condrocitos (Potdar & Jethmalani, 2015). A nivel de marcadores de superficie, el fenotipo que presentan las DP-MSCs cumple los criterios descritos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular junto con otros antígenos de superficie que serían causantes de su potencial proliferativo (Kawashima, 2012). Además, presentan una expresión baja de *HLA-DR Clase II* (Bernardi et al., 2011) lo que les convierte en un tipo celular inmunológicamente privilegiado, permitiendo un trasplante alogénico y siendo viable un teórico biobanco de DP-MSCs. Estas características, junto con la expresión de *OCT4* y *NANOG* (Huang, Chen, Lin, Shieh, & Chan, 2008), hacen que las DPSCs sean consideradas como una fuente de MSCs excelente para la medicina regenerativa (Cristaldi et al.,

2018; Hollands et al., 2018). Concretamente, se ha respaldado el uso de DP-MSCs como herramienta terapéutica en patologías y regeneración periodontal (L. Hu, Liu, & Wang, 2018), estudios en modelos animales indican que podrían ser útiles en el contexto de regeneración neural (Leong et al., 2012) y también apoyan su potencial uso en pacientes con la retina dañada (Bray, Cevallos, Gazarian, & Lamas, 2014). Por último, se ha descrito su capacidad para promover la osteogénesis en modelos animales (Xia et al., 2014) y, recientemente, se ha propuesto que las DP-MSCs se utilicen en terapias regenerativas para enfermedades óseas, entre otras condiciones (Kichenbrand, Velot, Menu, & Moby, 2019).

Como se ha mencionado anteriormente, se ha comprobado que las características que presentan las MSCs varían en su intensidad dependiendo del tejido de origen. Es por ello que en los últimos años se han realizado estudios comparativos de los potenciales de diferenciación entre MSCs aisladas de distintos tejidos o entre MSCs y células diferenciadas (Li et al., 2015; H. Ren et al., 2016; Strioga, Viswanathan, Darinskas, Slaby, & Michalek, 2012; Tamaki, Nakahara, Ishikawa, & Sato, 2013). Pese a esta cantidad de estudios, la realidad es que a día de hoy no existe ningún estudio comparativo entre los tres tipos de MSCs que han atraído más interés en la medicina regenerativa: BM-MSC, ASC y DP-MSC. También son escasos los estudios que hayan analizado conjuntamente el efecto y/o importancia del tejido de origen de las MSCs y el tipo de *scaffold* empleado.

En el contexto específico de regeneración ósea, aún queda por dilucidar la influencia que tiene el tejido de origen y la cerámica usada como *scaffold* en el potencial osteogénico de las MSCs. Lograr la maximización de la diferenciación osteogénica de las MSCs y, de este modo, potenciar la formación de hueso sería un paso de importancia capital en el campo de la medicina regenerativa ósea.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la literatura científica está descrito que las MSCs muestran diferente intensidad en las características funcionales según su tejido de origen. La hipótesis de partida de esta tesis doctoral es que el potencial osteogénico de las MSCs es una de las características funcionales influenciada por el tejido de origen.

Los objetivos de la presente tesis doctoral han sido:

1. Realizar un análisis comparativo de las características biológicas entre MSCs aisladas de médula ósea, tejido adiposo y pulpa dental cuando son cultivadas en plástico:
 - a. Comprobando que las células seleccionadas para este estudio cumplen los requisitos para ser definidas como MSCs realizando la caracterización fenotípica basada en marcadores de superficie como del potencial de diferenciación en los tres linajes celulares.
 - b. Evaluar la capacidad proliferativa de cada MSC midiendo sus respectivos tiempos de duplicación.
 - c. Determinar el potencial osteogénico de cada MSC realizando una cuantificación de la tinción de Rojo Alizarina.
2. Cultivar MSCs de médula ósea, tejido adiposo y pulpa dental sobre *scaffolds* biocerámicos de hidroxiapatita y beta-fosfato tricálcico para analizar el comportamiento biológico de cada constructo:
 - a. Se estudiará la viabilidad y actividad celular mediante el test Alamar Blue™.
 - b. La capacidad de colonización del material por parte de la MSCs se evaluará observando los constructos con microscopía electrónica de barrido.
 - c. El potencial osteogénico de cada constructo se analizará monitorizando la actividad ALP tras inducir la osteogénesis.
3. Definir cuál es la fuente de MSCs y constructo con mayor potencial osteogénico e interés para su aplicación clínica en el contexto de regeneración ósea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de los niveles relativos de expresión de las proteínas mediante el etiquetado iTRAQ

Previo al inicio de esta tesis doctoral, en el grupo de investigación se realizó un análisis proteómico cuyos resultados fueron analizados durante la presente tesis doctoral e incluidos en la misma.

Brevemente, a partir de donantes sanos se aislaron MSCs procedentes tanto del cartílago como hueso subcondral. El contenido total de proteína obtenido se resuspendió en 25 μ L de *buffer* disolución iTRAQ (ABSciex, Foster City, CA, EEUU) y su concentración fue determinada mediante el ensayo Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Se procedió a la digestión de cantidades iguales de proteína de cada localización anatómica y, seguidamente, se realizó el etiquetado iTRAQ (ABSciex, Foster City, CA, EEUU): se emplearon las etiquetas SB(116) y C(117). La separación de péptidos en fase inversa se realizó en un sistema LC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU). Las fracciones obtenidas tras ser separadas por un sistema nanoLC (Tempo, Eksigent, CA, EEUU) se depositaron en una placa MALDI y fueron analizadas por MSSM en un sistema 4800 MALDI-TOF/TOF (ABSciex, Foster City, CA, EEUU).

El análisis cuantitativo relativo se realizó con el *software* ProteinPilot (ABSciex, Foster City, CA, EEUU) usando el algoritmo Paragon™ para la identificación y cuantificación proteica. Finalmente, sólo se consideraron las proteínas identificadas con una confianza de al menos el 95%, un Prot Score mínimo de 1.3, un *p*-valor ≤ 0.05 y ratio ($\neq 1$).

Obtención muestras biológicas

Las muestras biológicas fueron obtenidas en el transcurso de distintas intervenciones quirúrgicas, específicas para cada tipo de muestra. De este modo, las células madre mesenquimales procedentes de médula ósea (BM-MSCs) se aislaron de médula ósea extraída de una punción-aspiración en la cresta ilíaca durante la realización de cirugías de reemplazamiento articular. En el caso de las células madre mesenquimales de tejido adiposo (ASCs), las muestras provinieron de fragmentos grasos de tejido subcutáneo adquiridos en reparaciones de hernias ventrales. Por último, con el fin de aislar células madre mesenquimales de pulpa dental (DP-MSCs) se recolectaron terceros molares de exodoncias rutinarias.

Todas las muestras biológicas usadas en la realización de la fase experimental de esta tesis doctoral fueron donadas por individuos sanos, sin patología crónica grave alguna diagnosticada. Todos ellos fueron debidamente informados previamente a la firma del consentimiento.

Células madre mesenquimales de médula ósea

Recogido el aspirado de médula ósea, se trasladó a una cabina de flujo laminar estéril (NU-437-400E, NUARIE, EEUU) y se llevó a cabo el siguiente procedimiento descrito por Gudleviciene *et al* (Gudleviciene, Kundrotas, Liudkeviciene, Rascon, & Jurga, 2015):

1. Se añade a la médula un volumen igual de tampón fosfato salino (PBS).
2. En un tubo cónico de 50ml se añade primero el Ficoll y después la muestra muy cuidadosamente para que no se mezclen ambas fases. La proporción de volúmenes tiene que ser: 1 parte de Ficoll y 3 de muestra (Figura 13A).
3. Centrifugación (BR4i, Jouan, Francia) a 900 *g* durante 30 minutos a 20°C sin freno.
4. Se recoge la interfase (Figura 13B) y transferir a un nuevo tubo cónico.
5. Lavado con 30ml de PBS y centrifugación a 450 *g* durante 15 minutos a 20°C.

6. El sobrenadante se retira dejando el precipitado celular.

El precipitado celular resultante se resuspendió en un volumen de 3ml de medio de cultivo completo: DMEM, suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), antibióticos y glutamina al 2% de volumen. Posteriormente se realizó la siembra en un frasco de cultivo de 25cm² (T25) y se introdujo en incubador (Galaxy 170S, New Brunswick, EE. UU.) a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Transcurridas 48 horas desde la siembra, las células no adheridas fueron eliminadas al realizarse el cambio de medio de cultivo.

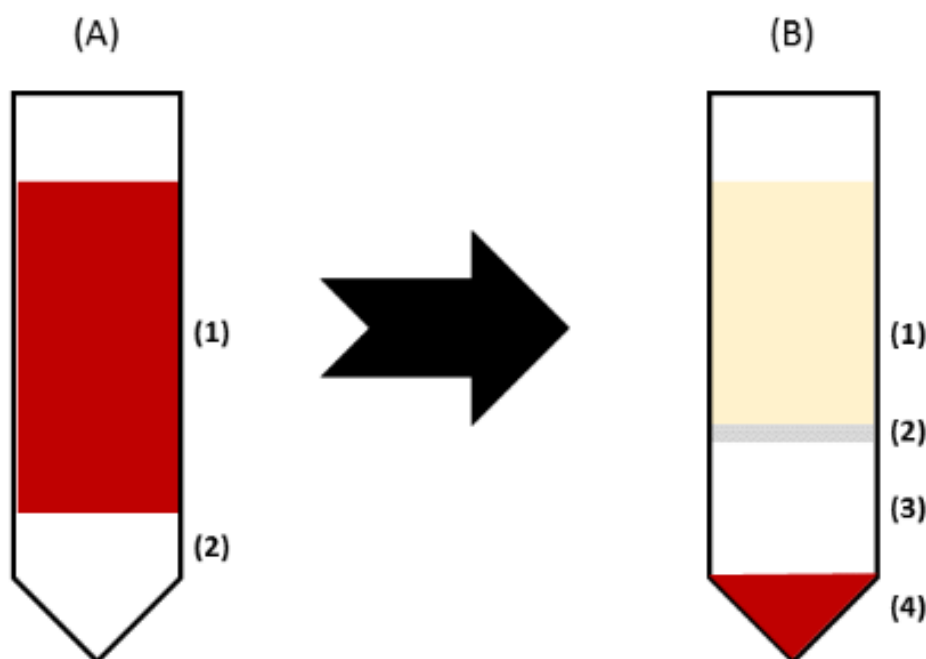


Figura 13. Aislamiento de BM-MSc por gradiente de densidad.

- (A) Pre-centrifugación: (1) muestra médula ósea y (2) ficoll.
 (B) Post-centrifugación: (1) capa superior, (2) interfase BM-MSc, (3) ficoll y (4) granulocitos y eritrocitos.

Células madre de tejido adiposo

Los fragmentos de tejido adiposo procedentes de las cirugías de reparación de hernias ventrales (Figura 14) presentaban un peso de 5-8 gramos -aproximadamente 5cm³-. Con el fin de facilitar la posterior digestión enzimática, se llevó a cabo una digestión mecánica de la muestra mediante tijeras quirúrgicas estériles. El protocolo para la digestión enzimática es el mismo que el empleado por Yang *et al* (Yang et al., 2011):

1. Activación de la colagenasa tipo I (6x): incubación en baño caliente a 37°C durante una hora.
2. La muestra homogeneizada se traspasa a un tubo cónico.
3. Se añade PBS 1X hasta un volumen de 40ml.
4. Centrifugar a 450 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Descartar la fracción soluble inferior junto con el pellet, dejando la fracción grasa.

6. Repetir los pasos 2 y 3 (x2).
7. Añadir a la fracción grasa 7ml de collagenasa tipo I y PBS hasta un volumen final de 40ml.
8. Invertir repetidamente e incubar a 37°C con agitación suave durante una hora.
9. Inactivar añadiendo 5ml de FBS e inversión repetida.
10. Centrifugar a 450 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente.
11. Retirar y descartar todas las fases (superior, media, interfase e inferior), dejando únicamente el pellet celular.
12. Lavar el pellet resuspendiéndolo en 40ml de PBS.
13. Centrifugar a 450 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente.
14. Retirar y descartar el sobrenadante. Resuspender el pellet en 5ml de medio de cultivo completo.
15. Filtrar las células usando un filtro de nylon de 100µm seguido de un lavado del filtro con 10ml de PBS.
16. Centrifugar a 450 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente.

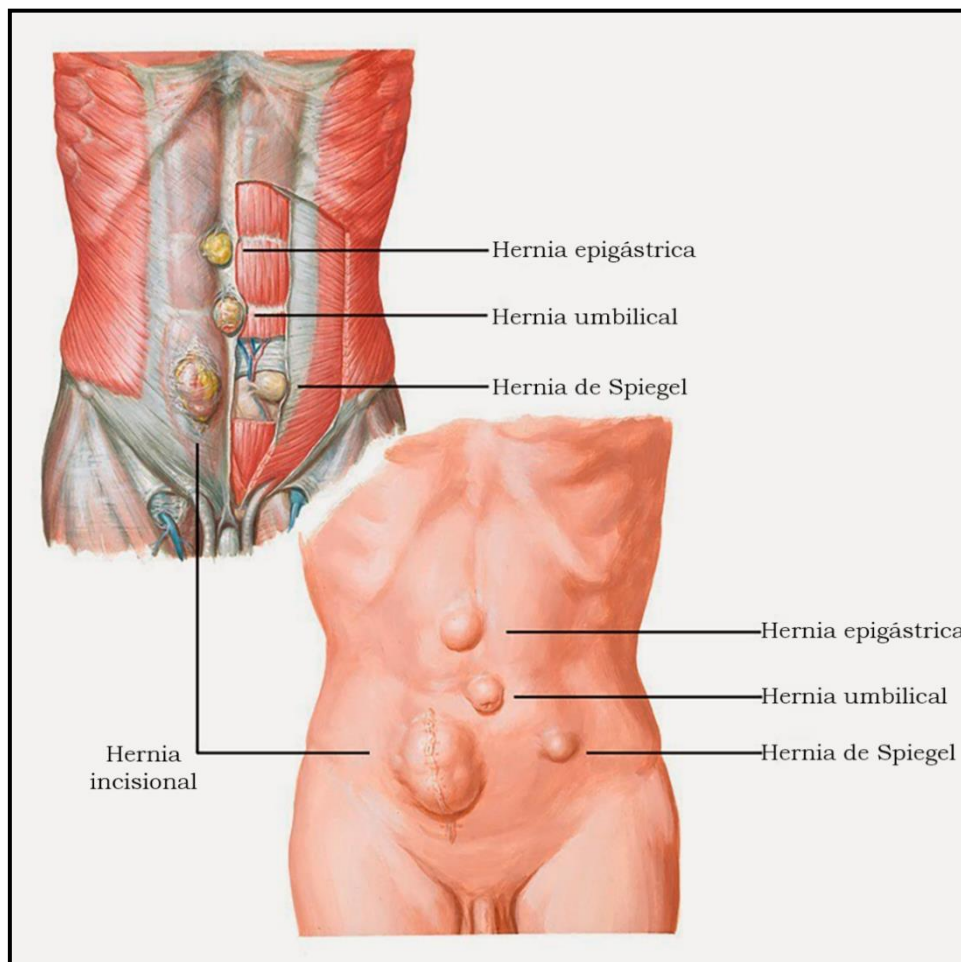


Figura 14. Localización anatómica de las distintas hernias ventrales. Imagen modificada a partir de Atlas de anatomía humana (7ª Edición) - FH Netter

El precipitado celular resultante se resuspendió en un volumen de 3ml de medio de cultivo completo: DMEM, suplementado con 10% de FBS, antibióticos y glutamina al 2% de volumen. Posteriormente se realizó la siembra en un T25 y se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Transcurridas 24 horas desde la siembra, las células no

adheridas (eritrocitos en su mayoría) fueron eliminadas al realizarse el cambio de medio de cultivo.

Células madre de pulpa dental

El aislamiento de las DP-MSCs se realizó en dos pasos:

- (1) Obtención de la pulpa dental.
- (2) Digestión enzimática de la pulpa dental.

El protocolo empleado para la obtención de la pulpa dental:

1. En el momento de su obtención, los cordales se bañaron en clorhexidina 0.5% durante 5 minutos.
2. Lavado con PBS para eliminar restos de clorhexidina.
3. Emplazamiento de la pieza dental entre gasas estériles, dentro de una bolsa de exploración estéril.
4. Fractura del cordal mediante presión mecánica ejercida por una prensa manual.
5. Extracción de la pulpa dental (Figura 15) con cucharilla de black esterilizada.
6. Lavado con PBS y fragmentación de la pulpa usando una hora de bisturí.

Una vez obtenida, lavada y fragmentada la pulpa dental, se llevó a cabo la digestión enzimática de la misma siguiendo el protocolo descrito por Huang *et al* (Huang, Sonoyama, Chen, & Park, 2006):

1. Preparación de la solución de digestión de 3mg/ml colagenasa tipo I y 4mg/ml dispasa tipo II.
2. Traspasar la pulpa troceada a un tubo cónico y añadir 5ml de la solución de digestión.
3. En un baño caliente a 37°C, digerir la muestra durante 30-60 minutos.
4. Filtrar las células empleando un filtro de nylon de 70µm, seguido de un lavado con 10ml de PBS.
5. Centrifugar a 450 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Descartar la solución enzimática.

El precipitado celular resultante se resuspendió en un volumen de 3ml de medio de cultivo para DP-MSCs: DMEM, suplementado con 20% de FBS, antibióticos y glutamina al 2% de volumen. Posteriormente se realizó la siembra en un T25 y se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Después de 48 horas desde la siembra, las células no adheridas fueron eliminadas al realizarse el cambio de medio de cultivo.

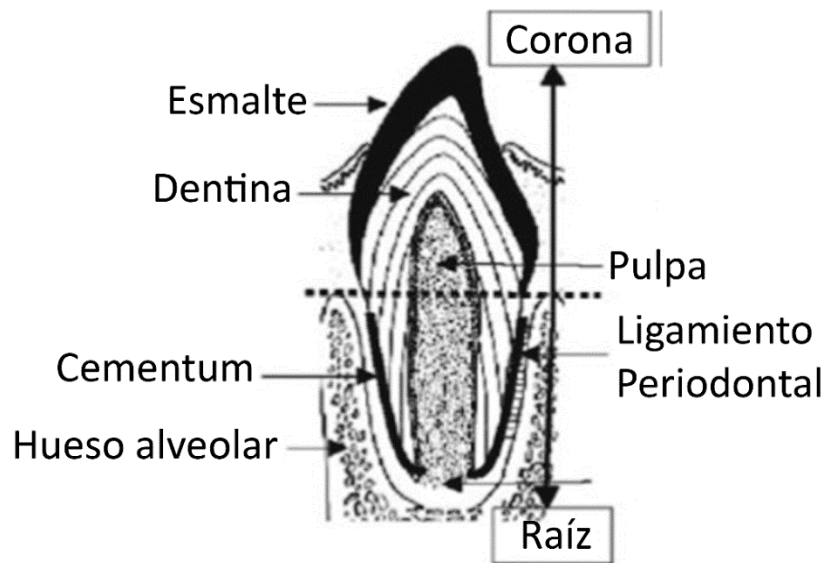


Figura 15. Representación esquemática de la anatomía del diente. En ella se describen los distintos componentes que forman un diente adulto humano. Imagen modificada a partir de (Aydin & Şahin, 2019).

Cultivos celulares

Expansión

En los cultivos celulares el medio de cultivo era cambiado rutinariamente cada 3 días. Previa al cambio de cultivo, se realiza una comprobación del estado de éste mediante microscopía óptica (DMI4000B, Leica Microsystems AG, Alemania). Cuando el cultivo hubiera alcanzado una confluencia aproximada del 80% se procedía al levantamiento de las células:

1. Retirar todo el medio de cultivo mediante aspiración.
2. Añadir un volumen de PBS al frasco de cultivo. El volumen a añadir depende del tamaño del frasco: para T25, 3ml; para T75, 4ml y para T175, 7ml. Dejar 1 minuto y retirar mediante aspiración.
3. Añadir un volumen de tripsina (TrypLE™ Express Enzyme (1X) no phenol red, Cat#12604013, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) al frasco de cultivo. El volumen a añadir depende del tamaño del frasco: para T25, 2ml; para T75, 2.5ml y para T175, 5ml. Dejar 5 minutos a 37°C. Comprobar en microscopio que las células se han despegado.
4. Una vez despegadas las células, inactivar la tripsina añadiendo FBS. Agitar levemente para asegurar la completa inactivación. El volumen a añadir depende del tamaño del frasco: para T25, 2ml; para T75, 2.5ml y para T175, 5ml.
5. Recoger todo el volumen y traspasarlo a un tubo cónico. Centrifugar a 450 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Retirar el sobrenadante y resuspender el precipitado celular en 1ml de medio de cultivo.

7. Realizar el recuento celular y sembrar a una densidad 1500 células/cm² en el número y tamaño de frasco de cultivo adecuado.
8. Incubar a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

La primera vez que se realizó este proceso se consideró que las células se encontraban en su “pase cero” (P0); a partir del cual eran expandidas en pases sucesivos (P1, P2, P3, ...) hasta ser congeladas en el pase de interés.

Recuento celular

Durante la expansión de los cultivos celulares, antes de la siembra en el frasco de cultivo, se realizó el recuento celular con el propósito de determinar la viabilidad y la tasa de proliferación celular. Para ello se empleó una tinción de *Trypan blue* al 0,4% (Cat# 15250061, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) y un hemocitómetro (cámara de Neubauer) para el siguiente procedimiento:

1. Resuspender el precipitado celular en 1ml de medio de cultivo.
2. Traspasar 10µL del resuspendido a un tubo de microcentrífuga.
3. Añadir 10µL de *Trypan blue* (dilución 1:2) y mezclar bien.
4. Colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos y, en un ángulo de 35°, transferir en la zona de carga del hemocitómetro 10µL de la dilución con una micropipeta. Dejar reposar 2 minutos para que las células precipiten al fondo de la cámara de conteo, facilitando su visualización.
5. Montar el hemocitómetro en la platina de un microscopio óptico. Observar con el aumento adecuado y realizar el recuento de células.
6. Teniendo en cuenta la dilución y el volumen inicial, calcular el número total de celular.

Se consideraron como células viables las más refringentes, que presentasen forma regular y carecieran de tinción intracelular azul. En este caso, siendo MSC el tipo celular en estudio sólo se contabilizaron las células presentes en las cuadrículas de los extremos de la cámara (Figura 16).

Cinética proliferación celular

Con los datos recabados durante los diferentes recuentos celulares realizados se calculó tanto el tiempo de duplicación (Td) como el número de divisiones celulares (Nd) aplicando las fórmulas:

- $T_d = T \ln_2 / \ln(N_f / N_i)$
- $N_d = 3.32 (\log N_f - \log N_i) + N_{di}$

En las que “T” representa el tiempo, en cualquier unidad, transcurrido al determinar el número de células finales (N_f) a partir del número de células iniciales (N_i). Para el cálculo del número de divisiones se tuvo en cuenta, además, el número de divisiones del que se partía (N_{di}).

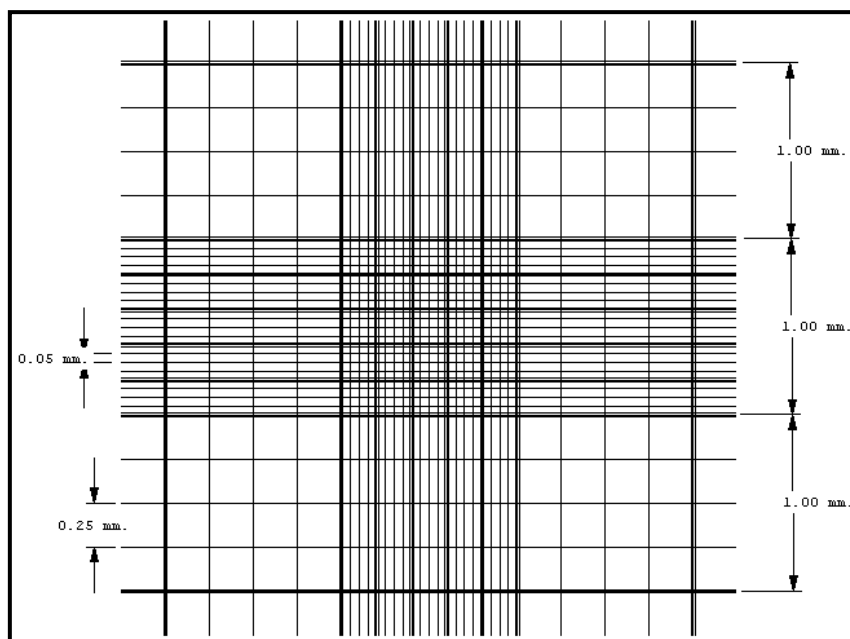


Figura 16. Cámara de Neubauer

Control contaminación: *Mycoplasma spp*

Dentro del dominio *Bacteria*, se encuentra la clase *Mollicutes* caracterizada por la ausencia de pared celular y ser parásita tanto en el reino *Plantae* como en el *Animalia*. Entre los parásitos en animales, destaca la familia *Mycoplasmataceae*, a la cual pertenece el género *Mycoplasma*, por ser capaz de producir enfermedad en los seres humanos y requerir colesterol para su crecimiento. Debido a la ausencia de pared celular (Figura 17), no son sensibles a los antibióticos que bloquean la síntesis de la pared celular, como los presentes en el medio de cultivo empleado. Además, en células eucariotas alteran la expresión normal de los genes, la inmunidad y el crecimiento celular.

Debido a que el género *Mycoplasma* representa un grave problema para la investigación celular se realizó de manera rutinaria análisis de contaminación en los cultivos usando el kit *Mycoplasma Gel Detection* (Cat# 90.021-4542, Biotools, España) que, basado en la amplificación del ARNr 16S, detecta las especies de *Mycoplasma* más frecuentes que infectan los cultivos celulares y cuyo protocolo tiene 3 pasos:

(A) Preparación de la muestra

Con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo, la muestra de sobrenadante de los cultivos (500-1000µL) se ha recoger cuando éstos se encuentren al 90-100% de confluencia, después de 48-72 horas del último cambio de medio:

1. Incubar la muestra a 95°C durante 10 minutos.
2. Centrifugar brevemente para eliminar el *debris* celular antes de pipetear la muestra.

Conservar las muestras a 4°C hasta un máximo de 7 días. Para almacenamientos más prolongados, conservar a -20°C.

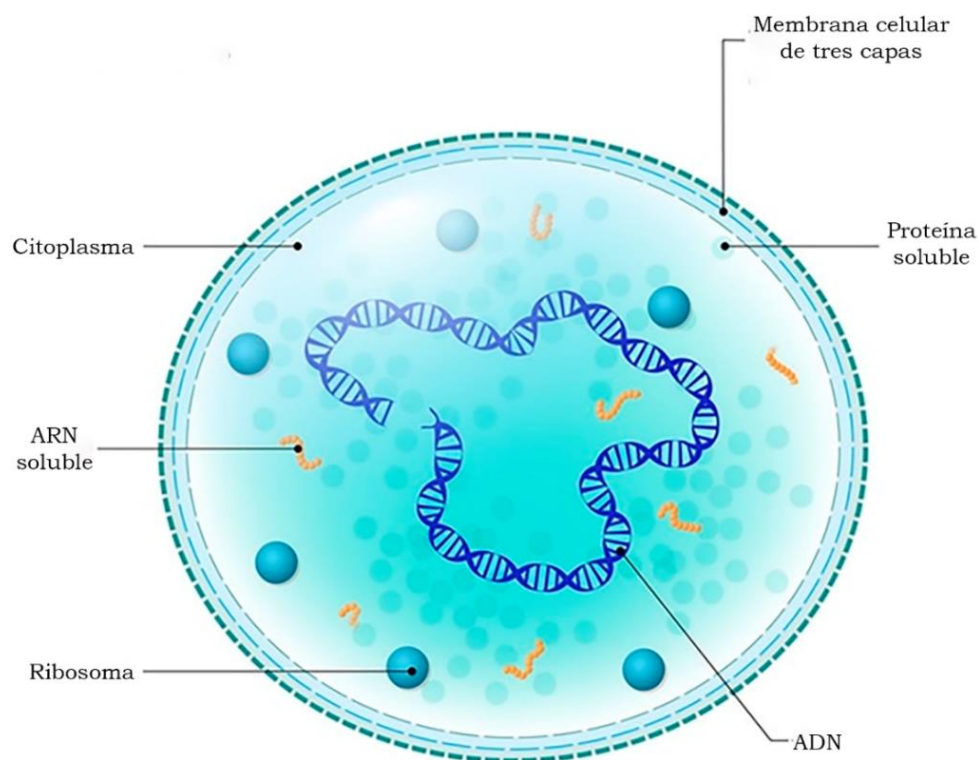


Figura 17. Representación esquemática de la estructura y componentes celulares de *Mycoplasma* spp. Destaca la ausencia de pared microbiana; hecho que provoca su resistencia a los antibióticos bloqueantes de síntesis de pared celular generalmente empleados en los medios de cultivo celular. Imagen modificada de Designua/Shutterstock.

(B) Preparación de los controles

1. Diluir el vial de *Gelified Internal Amplification Control* (IAC) y el vial de *Gelified Positive Control* (PC) en 500µL de Tris 10mM pH8 (o agua libre de nucleasas) y mezclar ligeramente con vórtex.
2. Realizar alícuotas de cada uno de los controles resuspendidos y conservar a -20°C hasta su utilización. Las alícuotas son de único uso: una vez descongeladas no se deben volver a congelar.

(C) Preparación de las mezclas de reacción

1. Calcular el número de reacciones necesarias sin olvidar incluir, al menos, un control negativo y uno positivo.
2. Añadir los diferentes componentes de reacción siguiendo las instrucciones de la Tabla 1.

Tabla 1

Preparación de mezclas de reacción para kit Mycoplasma Gel Detection.

Componente	Control (-)	Control (+)	Muestras
ADN IAC			2-4µL
ADN PC		5µL	
Muestra			2µL
Agua libre de nucleasas	25µL	20µL	Hasta 25µL

3. No resuspender, mezclar suavemente de manera manual y centrifugar ligeramente.
4. Programar el termociclador conforme a las instrucciones de la Tabla 2 e iniciar el programa.

Tabla 2

Programa de amplificación del material genético.

N.º Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	2 min
	95°C	15 seg
30	58°C	90 seg
	72°C	30 seg
1	72°C	5 min
	4-8°C	∞

5. Preparar un gel de agarosa al 2%.
6. Cargar 10µL del producto de reacción mezclado con el buffer de carga. Incluir carriles con marcador/es de peso molecular idóneos.
7. Migrar la electroforesis, verificar los productos de amplificación obtenidos e interpretar los resultados (Tabla 3).

Tabla 3

Interpretación de los resultados para kit Mycoplasma Gel Detection.

Muestra	Bandas visualizadas		Interpretación
	435-470bp	188bp	
Muestra+IAC	NO	NO	Falso negativo: inhibidor en la muestra o PCR inválida
	NO	SÍ	Ausencia de Mycoplasma en la muestra
	SÍ	NO	Alto contenido de Mycoplasma en la muestra, impide visualización del IAC
	SÍ	SÍ	Presencia de Mycoplasma
PC+IAC	NO	NO	PCR inválida
	NO	SÍ	Problema con el PC
	SÍ	NO	Problema con el IAC
	SÍ	SÍ	Patrón de bandas esperado
IAC	NO	NO	PCR inválida
	NO	SÍ	Patrón de bandas esperado
	SÍ	NO	Falso positivo: contaminación y problema con el IAC
	SÍ	SÍ	Falso positivo: IAC o agua contaminada
Control negativo	NO	NO	Resultado esperado
	NO	SÍ	Falso positivo: agua contaminada
	SÍ	NO	Falso positivo: agua contaminada
	SÍ	SÍ	Falso positivo: agua contaminada

Criogenización/conservación de las MSCs

Para realizar los experimentos del estudio de manera sincronizada, las muestras se congelaron en el pase de interés: generalmente P2 para la posterior expansión a la descongelación a P3. El protocolo para la criogenización de las muestras empleado fue:

1. Preparar medio congelación, compuesto por FBS y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% de volumen.
2. Retirar todo el medio de cultivo mediante aspiración.
3. Añadir 7ml de PBS al frasco de cultivo. Dejar 1 minuto y retirar mediante aspiración.
4. Añadir 5ml de tripsina (TrypLE™ Express Enzyme (1X) no phenol red, Cat#12604013, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) al frasco de cultivo. Dejar 5 minutos a 37°C. Comprobar en microscopio que las células se han despegado.
5. Una vez despegadas las células, inactivar la tripsina añadiendo 5ml de FBS. Agitar levemente para asegurar la completa inactivación.
6. Recoger todo el volumen y traspasarlo a un tubo cónico. Centrifugar a 450 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Retirar el sobrenadante y resuspender el precipitado celular en 1ml de medio de cultivo.
8. Realizar el recuento celular.
9. Centrifugar a 450 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
10. Retirar el sobrenadante y resuspender en medio de congelación y traspase al criotubo debidamente etiquetado.

11. Poner el criotubo en el recipiente de congelación (Mr Frosty, Cat#5100-001, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) relleno con isopropanol.
12. Depositar un mínimo de 24 horas en ultracongelador (U725-G, New Brunswick, EE. UU.) a -80°C.
13. Almacenaje en tanque de N₂ líquido hasta su utilización.

El proceso de descongelación de la muestra:

1. Calentar el baño de agua termostático a 37°C.
2. Introducir en el criotubo en el baño de agua.
3. Añadir en un tubo cónico 9ml de medio de cultivo.
4. Recoger la muestra cuando esté líquida, traspasarla al tubo cónico y mezclar bien.
5. Centrifugar a 450 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Retirar el sobrenadante y resuspender el precipitado celular en 1ml de medio de cultivo.
7. Realizar el recuento celular.
8. Sembrar a una densidad 1500 células/cm² en el número y tamaño de frasco de cultivo adecuado.

Caracterización celular

Los criterios mínimos a los que una célula ha de ajustarse para ser definida como MSC fueron establecidos por el comité de la ISCT en 2006 (Dominici et al., 2006) y son tres:

- (1) Las células han de presentar adherencia a plástico en condiciones de cultivo estándar.
- (2) Las células han de expresar las moléculas de superficie CD105, CD73 y CD90 además de carecer de las moléculas de superficie específicas del linaje hematopoyético CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79α o CD19 y HLA-DR.
- (3) Las células han de ser capaces de diferenciarse *in vitro* hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

Para comprobar que las células utilizadas cumplían con la totalidad de los criterios mínimos se realizó tanto la caracterización fenotípica basada en marcadores de superficie como del potencial de diferenciación en los tres linajes celulares.

Citometría de Flujo

Para realizar la caracterización fenotípica basada en marcadores de superficie se emplearon anticuerpos específicos conjugados con fluorocromos fluorescentes y los isotipos control correspondientes. Dado que las MSCs tiene autofluorescencia, se seleccionó como fluorocromo conjugado la ficoeritrina para evitar compensaciones en la longitud de onda correspondiente al color verde. Los anticuerpos empleados (todos de Miltenyi Biotec, Alemania) fueron:

- Anticuerpo CD90-PE (Cat#130-114-860)
- Anticuerpo CD73-PE (Cat#130-111-908)
- Anticuerpo CD105-PE (Cat#130-112-163)
- Anticuerpo CD45-PE (Cat#130-113-118)
- Anticuerpo CD34-PE (Cat#130-113-179)
- Anticuerpo CD14-PE (Cat#130-113-147)

- Control Isotipo IgG1 (Cat#130-119-859)
- Control Isotipo IgG2a (Cat#130-091-835)
- Control Isotipo REA (Cat#130-113-450)

De cada muestra se recogieron 2.5×10^5 células.

(A) Preparación de la muestra

1. Transferir las células a un tubo cónico de 15ml.
2. Añadir *Buffer autoMACS* hasta alcanzar un volumen de 10ml.
3. Centrifugar a 450 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Desechar el sobrenadante y resuspender en 1.5ml de *Buffer autoMACS*.
5. Colocar una placa de 96 pocillos en "V" sobre una base de hielo.
6. Repartir 100µL de la resuspensión celular en cada pocillo de la placa.
7. Centrifugar la placa a 450 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Retirar el sobrenadante volcando la placa sobre un papel de filtro.
9. Resuspender las células de cada pocillo con 100µL de *Buffer autoMACS*.

(B) Marcaje con anticuerpos

1. Hay 1 negativo, 2 controles de isotipo y 6 anticuerpos numerados. Añadir el volumen indicado para cada caso en la siguiente tabla:

Tabla 4

Volúmenes de cada reactivo que hay que añadir para el marcaje con anticuerpo.

Nada (Ø)	IgG1a IgG2a	REA Control	1	2	3	4	5	6
0 µl	2 µl + 2 µl	10 µl	2 µl	2µl	2 µl	2 µl	2µl	2 µl

2. Incubar 30 minutos a 4°C y oscuridad.
3. Centrifugar la placa a 450 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar el sobrenadante volcando la placa sobre un papel de filtro.
5. Resuspender las células en 100µL de *Buffer autoMACS*.
6. Centrifugar la placa a 450 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Retirar el sobrenadante volcando la placa sobre un papel de filtro.
8. Resuspender las células en 100µL de *Buffer autoMACS*.
9. Traspasar a tubos de citometría debidamente rotulados.
10. Completar hasta un volumen de 600µL con *Buffer autoMACS*.

Las células marcadas y fijadas fueron analizadas en un citómetro (FACSCalibur, BD Biosciences, USA) y posteriormente los resultados obtenidos fueron procesados con el *software* Kaluza, distribuido con el citómetro, por el personal de la Unidad de Citometría de Flujo del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos.

Diferenciación *in vitro*

Para la realización de la caracterización del potencial de diferenciación de las células se emplearon kits comerciales inductores específicos para cada uno de los linajes. Las células se encontraban en P3 en el momento de la diferenciación. Para ello, en una placa

de cultivo de 24 pocillos, se sembraron 50000 células en cada pocillo (2cm²) un día antes del inicio de cada diferenciación. Los cambios de medio se realizaron cada 3 días. A modo de control, se realizó un cultivo paralelo a cada diferenciación con medio de cultivo estándar, sin estímulo inductivo alguno.

Para todas las tinciones es necesaria la fijación celular empleando formaldehído 4%:

1. Disolver 4 gramos de paraformaldehído en 50ml de agua bidestilada.
2. Añadir mediante pipeta de Pasteur 3 gotas de NaOH 1M.
3. Calentar la solución a 60°C para homogeneizar.
4. Añadir a la solución 50ml de PBS 2X.
5. Ajustar el pH a pH7.
6. Conservar a temperatura ambiente.

Diferenciación osteogénica

Las células se diferenciaron usando un medio de cultivo de inducción a la osteogénesis (StemMACS™ OsteoDiff Media, Cat#130-091-678, Miltenyi Biotec, Alemania). El tiempo final del cultivo fue 21 días. En los días 1, 10 y 21 se realizó la determinación histoquímica del proceso osteogénico mediante tinción con Rojo Alizarina (Cat#106278, Merck Millipore, EE. UU.), que tiñe la matriz extracelular que contiene calcio:

1. Preparar la solución de trabajo: Rojo Alizarina al 2% en agua bidestilada; ajustar el pH a 4.1-4.3 con hidróxido de amonio (NH₄OH) al 0.5%; proteger de la luz y mantener a temperatura ambiente hasta su utilización.
2. Retirar el medio de cada pocillo.
3. Realizar 3 lavados con PBS.
4. Fijar con paraformaldehído 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Realizar 3 lavados con PBS.
6. Teñir con la solución de trabajo durante 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Realizar 3 lavados con agua bidestilada.
8. Observar a microscopio óptico. La matriz extracelular aparece de color rojo.

Diferenciación condrogénica

Aunque el sistema óptimo para la diferenciación condrogénica es el cultivo en forma de biomasas, el cultivo en placa empleado es un sistema también válido. El medio de inducción de la condrogénesis (StemMACS™ ChondroDiff Media, Cat#130-091-679, Miltenyi Biotec, Alemania) se cambió cada 3 días hasta el tiempo final, 21 días. El proceso condrogénico se evaluó mediante tinción Azul de Toluidina (Cat#115930, Merck Millipore, EE. UU.), que pone de manifiesto mucopolisacáridos que confirman la diferenciación condrocítica:

1. Preparar la solución de trabajo: 0.1 gramos de Azul de Toluidina en 100ml de agua bidestilada.
2. Retirar el medio de cada pocillo.
3. Realizar 3 lavados con PBS.

4. Fijar con paraformaldehido 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Realizar 3 lavados con PBS.
6. Teñir con la solución de trabajo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Realizar 3 lavados con agua bidestilada.
8. Observar a microscopio óptico.

Diferenciación adipogénica

El medio empleado fue un medio de inducción adipogénica (StemMACS™ AdipoDiff Media, Cat#130-091-677, Miltenyi Biotec, Alemania) y el avance de la diferenciación adipogénica fue evaluado en los días 1, 10 y 21 mediante tinción *Oil Red O* (Cat# O0625, Sigma-Aldrich, EE. UU.) que detecta los adipocitos, confirmando la diferenciación:

1. Preparar solución *stock*: 0.5 gramos de *Oil Red O* en 100ml de isopropanol. Proteger de la luz y conservar a temperatura ambiente.
2. Preparar solución de trabajo: hacer una dilución con un ratio en los volúmenes de 6:4 (solución *stock*:agua bidestilada); dejar reposar 15 minutos; filtrar mediante papel de filtro; proteger de la luz y utilizar en un periodo máximo de 2 horas.
3. Retirar el medio de cada pocillo.
4. Realizar 3 lavados con PBS.
5. Fijar con paraformaldehido 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Realizar 3 lavados con PBS.
7. Realizar lavado único con isopropanol 60%.
8. Teñir con solución de trabajo durante 6 minutos a temperatura ambiente.
9. Realizar lavado único con isopropanol 60%.
10. Realizar 3 lavados con PBS.
11. Observar a microscopio óptico. Los adipocitos presentan color rojo.

Análisis de imagen

Durante la caracterización fenotípica de las MSCs se realizó un registro fotográfico a lo largo de cada diferenciación inducida de la evolución en la intensidad de las tinciones correspondientes a los tres linajes (osteogénico, condrogénico y adipogénico). Las fotografías tomadas a día 21 de diferenciación osteogénicas fueran analizadas usando el programa informático ImageJ (versión 1.43, National Institutes of Health, EE. UU.). En concreto, se cuantificó en términos porcentuales el área coloreada por la tinción Rojo Alizarina del cultivo celular en diferenciación.

Comportamiento biológico de las MSCs cultivadas sobre *scaffolds* biocerámicos

Biomateriales cerámicos

Para esta tesis se emplearon *scaffolds* de dos biomateriales cerámicos frecuentemente usados en Cirugía Oral y Maxilofacial:

1. Beta-fosfato tricálcico (β -TCP)
2. Hidroxiapatita (HA)

Los *scaffolds* fueron procesados *ad hoc* para los ensayos llevados a cabo durante la realización de esta tesis y aportados por la Dra. Carmen Baudín y la Dra. Pilar Pena, pertenecientes al Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV-CSIC). Las características de los *scaffolds* empleados están resumidas en la Tabla 5.

Tabla 5

Principales características de los scaffolds empleados.

Biomaterial	Diámetro scaffold (mm)	Altura scaffold (mm)	Temperatura sinterización (°C)	Programa sinterización	Porógeno (wt%)
Hidroxiapatita	18	4	1250	3 horas 5°C	0
Beta-fosfato tricálcico	18	4	1130	2 horas 2°C	0/1/5/10

Brevemente: los polvos de cada biomaterial fueron analizados en un difractómetro de rayos X y microscopía electrónica. La sinterización de los *scaffolds* se realizó mediante presión mecánica del *slurry*, formado por el polvo del biomaterial diluido en agua bidestilada, dentro de un molde cilíndrico. Posteriormente al secado de los *scaffolds*, los cuerpos verdes sintetizados se introdujeron en un horno para su sinterización; cada biomaterial tuvo un programa de sinterización específico (Tabla 5). En caso de que fuera necesario, la superficie del *scaffold* fue pulida usando pasta de diamante. Por último, los *scaffolds* fueron esterilizados en autoclave (120°C durante 20 minutos) antes de ser empleados en los distintos ensayos.

Formación de constructos

El paso previo a la formación de los constructos, estructura formada por la combinación de las MSCs y el *scaffold*, fue embeber el *scaffold* en medio de cultivo completo durante las 24 horas previas a la siembra celular para su hidratación y mejorar así la adherencia de las células.

Una vez hidratados los *scaffolds* se colocaron en un pocillo de una placa de 24 pocillos de fondo plano y la siembra se realizó de dos pasos:

1. Se añadió medio de cultivo completo conteniendo distintas suspensiones celulares:
 - a. 8000 MSCs.
 - b. 16000 MSCs.

c. 32000 MSCs.

2. Se añadió medio de cultivo completo u osteoinductivo conteniendo una suspensión celular de 50000 MSCs.

Una vez adheridas las células al *scaffold* y formado el constructo el medio de cultivo era cambiado rutinariamente cada 3 días hasta la finalización de los diferentes ensayos realizados.

Test de viabilidad y actividad celular

Con el fin de detectar algún posible efecto de citotoxicidad del biomaterial sobre las células junto con la viabilidad celular y actividad metabólica de éstas, se realizó un ensayo empleando el indicador AlamarBlue™ (Cat#DAL1100, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

Se eligió este indicador ya que es ampliamente referenciado en estudios de citotoxicidad y viabilidad celular, siendo empleado en una gran variedad de sistemas biológicos y ambientales (Rampersad, 2012). Entre los sistemas biológicos en los que ha sido usado se encuentran bacterias, levaduras, hongos y distintos tipos celulares humanos: fibroblastos (Voytik-Harbin, Brightman, Waisner, Lamar, & Badylak, 1998), líneas inmortalizadas (Nakayama, Caton, Nova, & Parandoosh, 1997), linfocitos (De Fries & Mitsuhashi, 1995) y células neuronales primarias (White, DiCaprio, & Greenberg, 1996).

El principio activo del indicador AlamarBlue™ es la resazurina, descubierta en 1871 (Weselsky, 1871) y empleada por primera vez para identificar una posible contaminación en la leche en 1929 (Pesch, K. L., & Simmert, 1929), un colorante permeable a las células, no tóxico, de color azul y no fluorescente. Una vez dentro de las células vivas es reducido a resorufina, altamente fluorescente y de color rojo. Este cambio ocurre porque la resazurina actúa como aceptador intermediario de electrones en la cadena de transporte de electrones, sin interferir en el normal funcionamiento de esta (Page, Page, & Noel, 1993), al tener un potencial oxidación-reducción de +380 mV a pH7 y 25°C y ser reducido por NADPH, FADH, FMNH y los citocromos.

Al añadir el indicador AlamarBlue™ a un cultivo celular, las células oxidan de manera constante la resazurina (Figura 18) produciendo un cambio tanto de color (de azul a rojo) como un marcado aumento en la fluorescencia del medio de cultivo por lo que se puede monitorizar el ensayo en lectores de placa de fluorescencia como de absorbancia.

El ensayo se realizó a las 24 horas, 4 días y 7 días posteriores a la siembra de las células en los *scaffolds*, siendo el protocolo empleado el siguiente:

1. Añadir el indicador AlamarBlue™ en un 10% del volumen del medio de cultivo.
2. Pipetear o mover suavemente la placa para la correcta mezcla.
3. Cubrir la tapa, protegiéndola de la luz.
4. Incubar a 37°C hasta que se aprecie el cambio de color en el medio. Mínimo una hora.
5. Traspasar un volumen de 100µL de cada muestra a un pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo plano.
6. Leer en el lector de placas (Heales MB-500, Shenzhen Heales Technology Development Co. Ltd., China) la absorbancia a 570nm.

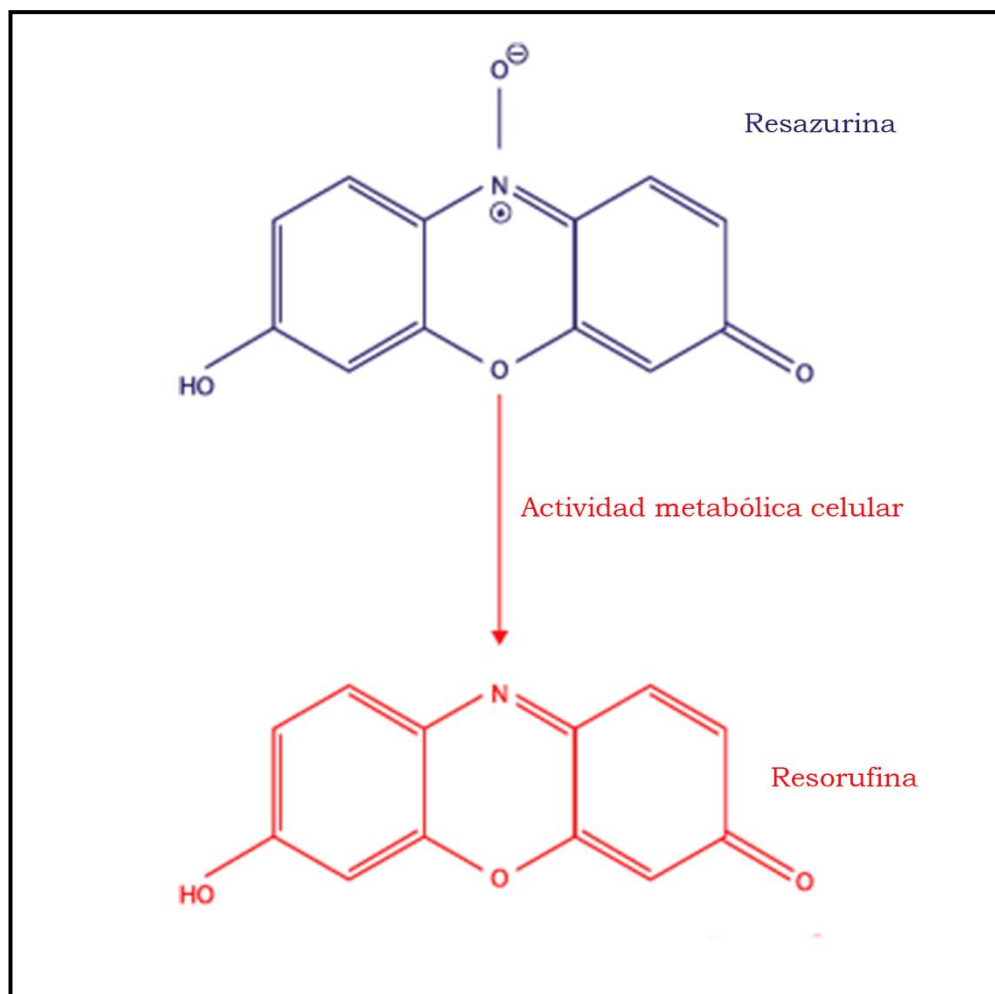


Figura 18. Estructura química y proceso de oxidación de resazurina a resorufina. Esta oxidación es resultado de la actividad metabólica de las células ya que la resazurina actúa como aceptador intermediario en la cadena de transporte de electrones. A nivel macroscópico, la oxidación produce un cambio de color (de azul a rojo) por lo que se puede cuantificar mediante un lector colorímetro.

Compromiso osteogénico

El correcto establecimiento de la osteogénesis de las MSCs cultivadas en los biomateriales fue evaluada mediante la monitorización de la actividad de la ALP a lo largo del proceso de diferenciación osteogénica ya que ésta incrementa en las fases iniciales del compromiso osteoblástico (Gronthos et al., 1999). Para cuantificar la actividad ALP se realizó un ensayo colorímetro basado en ELISA empleando un kit comercial (Cat#37629, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) que tiene como sustrato PNPP (*p*-nitrofenilfosfato) y al reaccionar con la ALP desarrolla color amarillo (Figura 19).

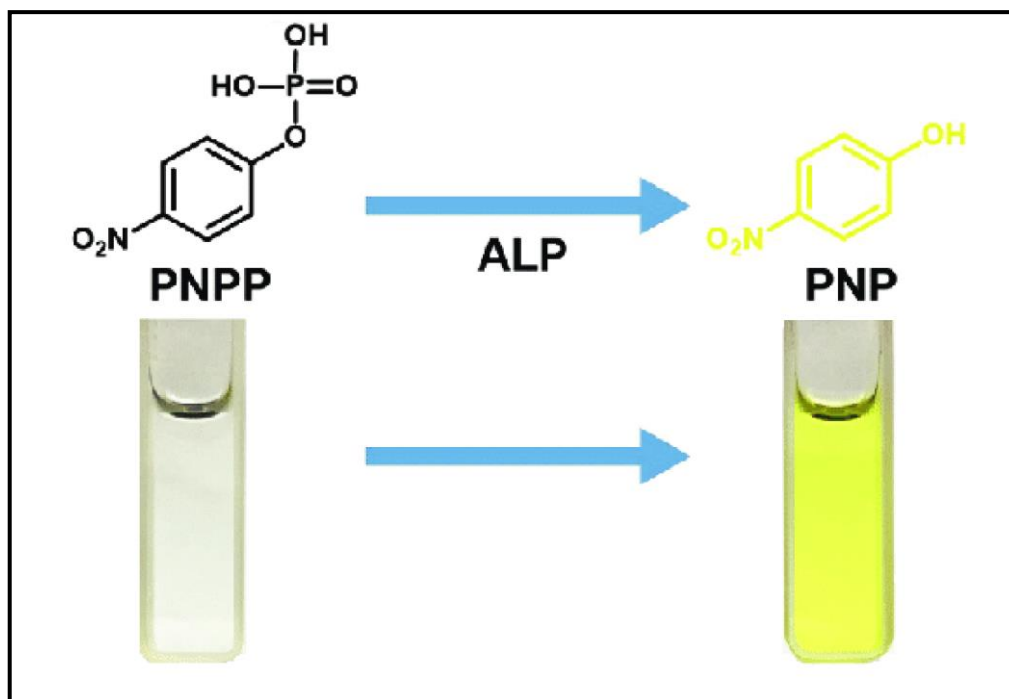


Figura 19. Estructura química del PNPP que sirve como sustrato para la ALP, dando como resultado PNP. Como resultado de esta reacción enzimática, a nivel macroscópico se da un cambio de color: de una sustancia incolora (PNPP) a una sustancia de color amarillo (PNP) que es cuantificable mediante un lector colorímetro. Imagen modificada de (Zhang, Lu, Lei, Hou, & Wu, 2017).

En humanos existen 4 alcalinas fosfatasa distintas según su especificidad tisular: intestino, placenta, tipo placentario y no específica de tejido (TNAP). Cada una de estas proteínas es codificada por un gen diferente (Moss, 1992), estando mapeados los tres primeros en el cromosoma 2 y el correspondiente a la TNAP en el cromosoma 1. Por ello la ALP es considerada una proteína ubicua en el organismo y, por consiguiente, no específica de ningún tejido. La variante presente en el tejido óseo, la TNAP, es la misma que se expresa en el hígado y en riñón.

Pese a que la TNAP tiene múltiples y diversas funciones en el ser humano, se sabe que en el contexto de la formación de hueso posee un rol importante al liberar fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos (Whyte et al., 1995) y permitir la mineralización de la matriz orgánica o sustancia osteoide formada por los osteoblastos (Anderson, 1995). También se ha demostrado que en el proceso de calcificación el gen que codifica para la TNAP es uno de los primeros en expresarse y que sus niveles de ARN mensajero aumentan de manera constante después de la estimulación durante 14 días (Qi et al., 2003; Shui, Spelsberg, Riggs, & Khosla, 2003). Por último, mutaciones en el gen codificante para la TNAP producen fenotipos de hipomineralización esquelética como en el caso de la hipofosfatasa (Whyte, 1994).

Por todo ello hace tiempo que está considerada como un marcador válido para la actividad osteogénica (Golub & Boesze-Battaglia, 2007) y también se ha descrito su expresión como indicador predictivo de la capacidad de formación ósea *in vivo* para BM-MSCs (Prins et al., 2014).

Durante la osteogénesis temprana se cuantificó la actividad ALP 24 horas y 7 días después de iniciar la diferenciación osteogénica siguiendo el siguiente protocolo:

1. Retirar completamente el medio del pocillo.
2. Lavar el constructo dos veces con PBS para retirar cualquier posible resto del medio.
3. Embeber el constructo en el buffer de lisis (0.1 wt%, Triton-X 100, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂).
4. Almacenar a -20°C hasta la realización de la cuantificación.
5. Llevar a temperatura de habitación las tabletas de PNPP.
6. Diluir el buffer de dietanolamina de 5X a 1X.
7. Disolver dos tabletas de PNPP (10mg) en 10ml de buffer de dietanolamina 1X.
8. Añadir 100µL de la solución PNPP a cada pocillo.
9. Incubar a temperatura de habitación durante 30 minutos o hasta que se desarrolle suficiente color.
10. Parar la reacción añadiendo 50µL de NaOH 2M a cada pocillo.
11. Leer la absorbancia a 405nm.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La colonización de los *scaffolds*, tanto de HA como de β -TCP, por parte de las diferentes MSCs junto con la adhesión y organización celular se analizó a las 24 horas y 7 días después de sembrar las células en los *scaffolds*.

En la preparación previa de las muestras biológicas para ser analizadas por MEB el secado, o deshidratación, por punto crítico es un paso esencial. El principio de este proceso consiste en deshidratar de manera progresiva la muestra mediante solventes orgánicos que desplacen el contenido acuoso de las muestras y, finalmente, sustituir el solvente orgánico por CO₂ líquido. Realizando este procedimiento se garantiza la correcta conservación de la microestructura y forma original de la muestra biológica para su posterior observación y análisis mediante MEB.

Fijación y deshidratación de las muestras

1. Preparar la solución fijadora: compuesta por paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5%.
2. Embeber el constructo en la solución fijadora durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar con PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente (x3).
4. Incubar en una solución de tetraóxido de osmio al 1% durante 45 minutos.
5. Lavar con PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente (x3).

Punto crítico

1. Retirar el PBS.
2. Embeber el constructo en etanol al 30% durante 10 minutos.
3. Retirar el etanol al 30%.
4. Embeber el constructo en etanol al 50% durante 10 minutos.
5. Retirar el etanol al 50%.

6. Embeber el constructo en etanol al 70% durante 10 minutos.
7. Retirar el etanol al 70%.
8. Embeber el constructo en etanol al 96% durante 10 minutos.
9. Retirar el etanol al 96%.
10. Embeber el constructo en etanol al 100% durante 10 minutos.
11. Introducir el constructo en el dispositivo de punto crítico (referencia) donde se realizará el intercambio de etanol por CO₂.
12. Realizar la metalización del constructo con oro vaporizado.

Visualización microscópica

El análisis cualitativo de todos los constructos se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME) del Campus de Moncloa por el personal técnico del mismo. Para el análisis fue empleado el microscopio JSM 6400 (JEOL, Japón) por ser el modelo especialmente indicado para la observación y análisis de superficie de materiales y biológicos.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó empleando el programa GraphPad Prism versión 7.00 (GraphPad Software, La Jolla California EEUU, www.graphpad.com). Se realizaron comparaciones para cada una y entre todas las variables (tiempos de experimento, tipo de medio de cultivo, biocerámica y localización anatómica). Los *p*-valor se calcularon mediante la prueba *t* de dos colas de Student, la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, la prueba de Kruskal-Wallis y ANOVA unidireccional. El nivel de significación se determinó en $p < 0,05$ para que las diferencias sean consideradas como estadísticamente significativas. Cada experimento se realizó con réplicas. Los resultados se expresaron como media y error estándar.

RESULTADOS

Análisis proteómico

En busca de una posible expresión de proteínas diferentes entre las MSCs localizadas en el hueso subcondral y cartílago se realizó un análisis comparado mediante iTRAQ. Los resultados revelaron la identificación de un total de 1012 proteínas únicas en las muestras. Entre todas ellas, 50 presentaban una abundancia diferencial en el hueso subcondral (Tabla 6): 25 proteínas estaban sobre-expresadas (>1.5276) y 25 proteínas infra-expresadas (<0.8872).

Caracterización celular para MSC

La citometría de flujo evidenció la expresión de marcadores de las MSCs empleadas en la realización de esta tesis (Figura 20):

- a) Expresión positiva para CD73, CD90 y CD105.
- b) Expresión negativa para CD14, CD34, CD45.

También se confirmó la capacidad de las MSCs para diferenciarse en los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico (Figura 21).

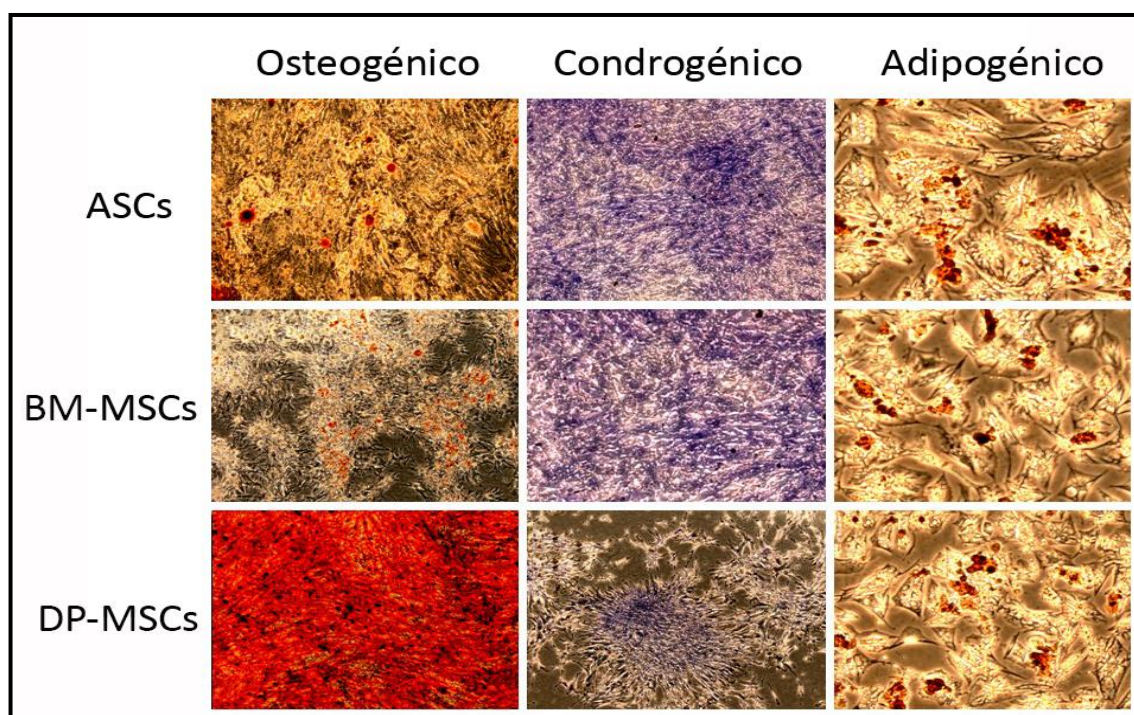


Figura 21. Imágenes de microscopio óptico (x5) a día 21 del proceso de diferenciación a los tres linajes celulares de las MSCs aisladas de los tres tejidos.

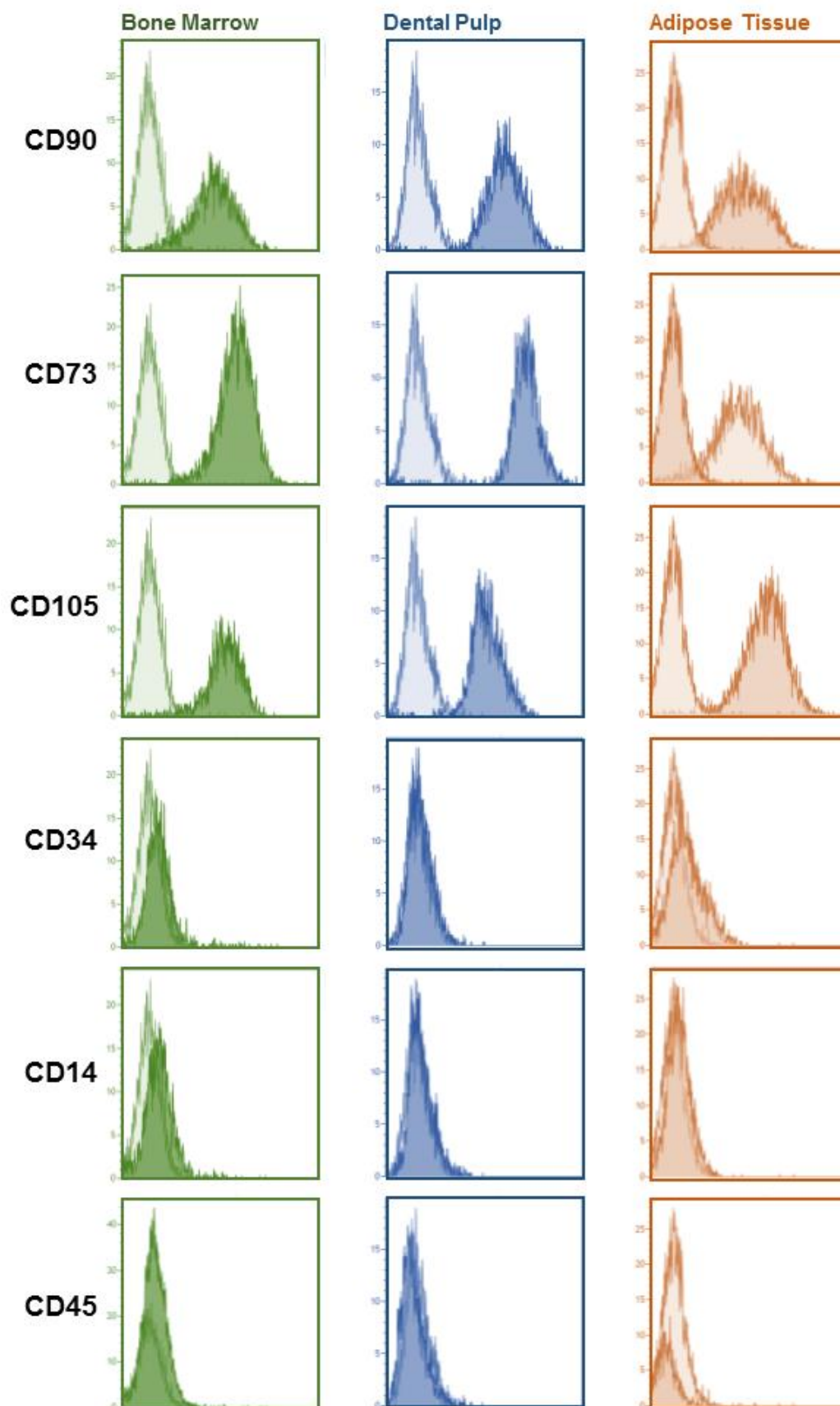


Figura 20. Histogramas individuales para cada uno de los distintos marcadores de superficie obtenidos al analizar mediante citometría de flujo las MSCs aisladas y empleadas en los distintos ensayos.

Proliferación celular

Los resultados obtenidos tras medir la proliferación celular de las MSCs durante su cultivo en plástico están reflejados en la figura 22. BM-MSCs y ASCs mostraron el mismo tiempo de duplicación celular mientras que DP-MSCs se evidenció como el tipo celular más rápido con un tiempo de duplicación más de cinco veces inferior (ASC=10 días, BM-MSC=10 días, DP-MSC=1.76 días, $p=0.0002$).

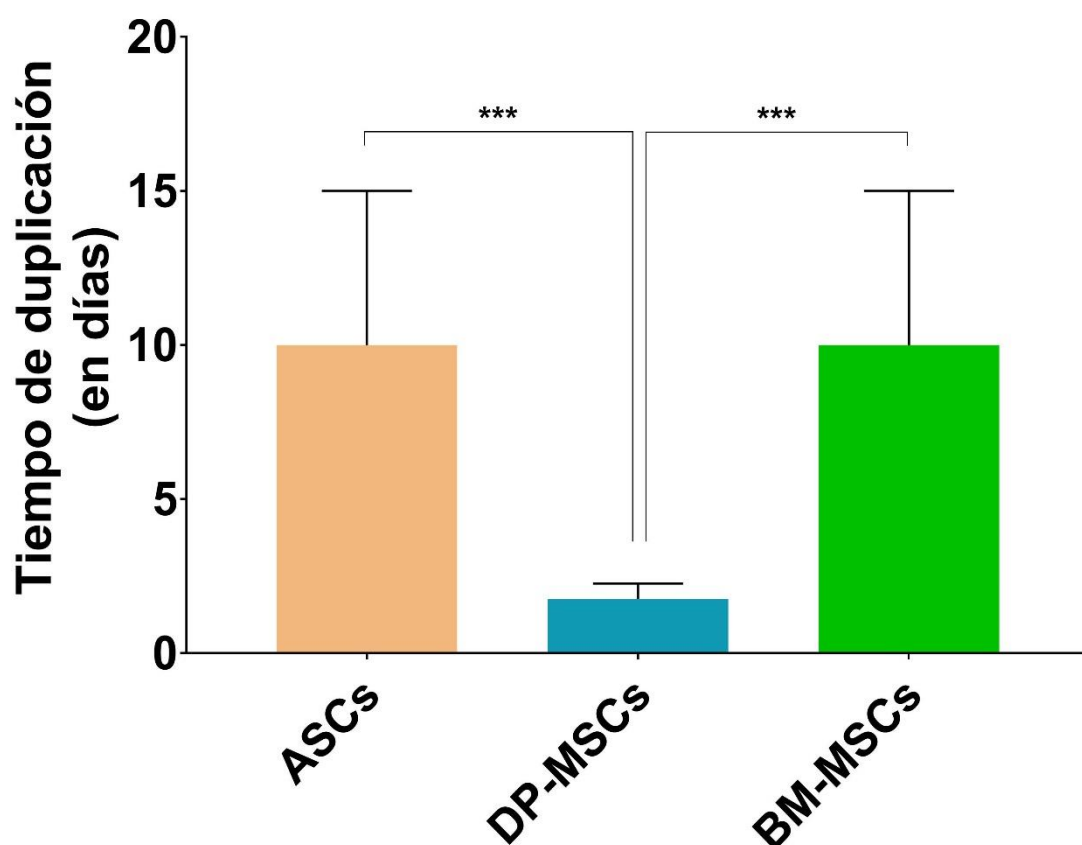


Figura 22. Tiempo de duplicación (en días) para las MSC aisladas de cada uno de los tres tejidos: ASC, tejido adiposo; DP-MSC, pulpa dental y BM-MSC, médula ósea. Los datos se muestran en Media $\pm$ SD. Grado de significancia: *** ≤ 0.001 .

Tabla 6

Proteínas expresadas de manera diferencial identificadas en MSCs aisladas de hueso subcondral en comparación con MSCs aisladas del cartílago.

Uniprot ID	Gen	Proteína	Fold change	Cobertura	Nº Peptidos	p-valor
AMPN_HUMAN	ANPEP	Aminopeptidase N	11,2720	38,1	27	0,0001
PALLD_HUMAN	PALLD	Palladin	4,6989	13,4	4	0,0145
K2C1_HUMAN	KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	4,3652	30,6	11	0,0164
TPM1_HUMAN	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	4,3652	41,6	13	0,0173
TAGL_HUMAN	TAGLN	Transgelin	4,2855	68,2	13	0,0001
K1C10_HUMAN	KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	3,5645	26,5	8	0,0085
FRIH_HUMAN	FTTH1	Ferritin heavy chain	3,4356	45,9	3	0,0340
DHB4_HUMAN	HSD17B4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	3,4041	19,2	5	0,0078
VIME_HUMAN	VIM	Vimentin	3,3420	91,6	235	0,0291
SQRD_HUMAN	SQRDL	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	2,9923	29,3	10	0,0030
PDIA1_HUMAN	P4HB	Protein disulfide-isomerase	2,7290	71,3	48	0,0028
KPYM_HUMAN	PKM2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2,6062	76,5	69	0,0123
ATPB_HUMAN	ATP5B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	2,5351	65,6	21	0,0118
GRP78_HUMAN	HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	2,5119	69,0	53	0,0001
GLCM_HUMAN	GBA	Glucosylceramidase	2,4210	16,0	4	0,0472
DPYL3_HUMAN	DPYSL3	Dihydropyrimidinase-related protein 3	2,3768	47,0	14	0,0232
SPTB2_HUMAN	SPTBN1	Spectrin beta chain, brain 1	2,0512	28,2	31	0,0251
GDIR1_HUMAN	ARHGDI1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	2,0137	59,8	8	0,0105
ACADV_HUMAN	ACADVL	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	1,8707	28,7	7	0,0486
ATPA_HUMAN	ATP5A1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	1,8535	57,7	24	0,0070
MYL6_HUMAN	MYL6	Myosin light polypeptide 6	1,7865	86,8	16	0,0487
LMO7_HUMAN	LMO7	LIM domain only protein 7	1,6144	28,4	11	0,0436
5NTD_HUMAN	FLNA	5'-nucleotidase	1,5704	53,5	22	0,0440
5NTD_HUMAN	FLNA	5'-nucleotidase	1,5704	53,5	22	0,0440
FLNA_HUMAN	FLNA	Filamin-A	1,5276	61,4	126	0,0036

Resultados

HS90A_HUMAN	HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	1,5276	56,4	29	0,0351
H32_HUMAN	HIST2H3A	Histone H3.2	0,8872	36,0	7	0,0298
H2AJ_HUMAN	H2AFJ	Histone H2A.J	0,7798	41,1	7	0,0365
PDLI7_HUMAN	PDLIM7	PDZ and LIM domain protein 7	0,7311	12,9	1	0,0042
ALDR_HUMAN	AKR1B1	Aldose reductase	0,6918	37,0	5	0,0237
FLNC_HUMAN	FLNC	Filamin-C	0,6310	14,8	14	0,0145
MVP_HUMAN	MVP	Major vault protein	0,5649	49,7	23	0,0078
VINC_HUMAN	VCL	Vinculin	0,5546	41,5	23	0,0245
RS15A_HUMAN	RPS15A	40S ribosomal protein S15a	0,5248	47,7	4	0,0221
SFPQ_HUMAN	SFPQ	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	0,4966	21,1	3	0,0205
PLIN3_HUMAN	PLIN3	Perilipin-3	0,4875	55,8	14	0,0418
NNMT_HUMAN	NNMT	Nicotinamide N-methyltransferase	0,4742	31,8	6	0,0400
1433Z_HUMAN	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	0,4699	71,8	14	0,0217
PRDX1_HUMAN	PRDX1	Peroxiredoxin-1	0,4169	70,9	21	0,0199
ANX11_HUMAN	ANXA11	Annexin A11	0,3733	36,4	9	0,0014
G6PD_HUMAN	G6PD	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,3664	43,5	15	0,0006
HYEP_HUMAN	EPHX1	Epoxide hydrolase 1	0,3467	19,6	7	0,0069
6PGD_HUMAN	PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	0,2911	38,3	10	0,0040
CALU_HUMAN	CALU	Calumenin	0,2655	53,3	14	0,0057
NQO1_HUMAN	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	0,2512	46,0	11	0,0153
TKT_HUMAN	TKT	Transketolase	0,1486	56,0	21	0,0051
ANXA5_HUMAN	ANXA5	Annexin A5	0,1294	78,4	38	0,0002
ENOA_HUMAN	ENO1	Alpha-enolase	0,1000	84,3	54	0,0419
ANXA2_HUMAN	ANXA2	Annexin A2	0,0871	87,6	74	0,0019
IBP3_HUMAN	IGFBP3	Insulin-like growth factor-binding protein 3	0,0802	39,9	5	0,0424
DEST_HUMAN	DSTN	Destrin	0,0614	65,5	8	0,0245

Nota: Las proteínas están ordenadas según el Fold-change que presentan, en orden descendiente, y en negrita se encuentran las que previamente han sido relacionadas con el proceso osteogénico.

Cuantificación del potencial osteogénico *in vitro* de las MSCs

La cuantificación de la tinción de Rojo Alizarina realizada en MSCs diferenciadas *in vitro* al linaje osteogénico (Figura 23) define a DP-MSCs como el tipo celular con la mayor área teñida de las tres: ASC=9.4210%, BM-MSC=39.7150%, DP-MSC=72.5965%, $p=0.0038$.

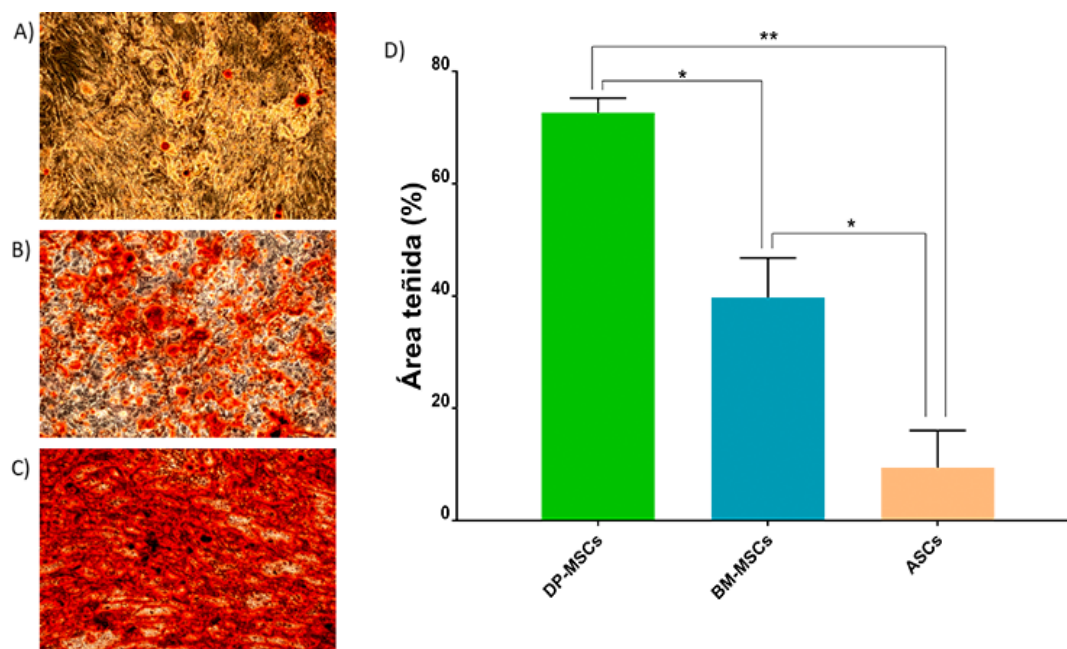


Figura 23. (A) Tinción Rojo Alizarina de ASC tras 21 días de cultivo con medio osteogénico (x10) (B) Tinción Rojo Alizarina de BM-MSC tras 21 días de cultivo con medio osteogénico (x10) (C) Tinción Rojo Alizarina de DP-MSC tras 21 días de cultivo con medio osteogénico (x10) (D) Cuantificación de la tinción Rojo Alizarina de acuerdo con la fuente celular: tejido adiposo (ASC), pulpa dental (DP-MSC) y médula ósea (BM-MSC). Los datos se muestran en Media±SD. Grado de significancia: * ≤0.05 ** ≤0.01.

Ensayos MSCs cultivadas sobre CaPs

Ensayos de viabilidad y actividad celular

La figura 24 muestra los resultados obtenidos en los ensayos realizados en constructos de β -TCP de distintas porosidades sembrados por diferentes densidades celulares de ASCs. En el caso de las ASCs con una densidad celular de 8000 células (Figura 24A), los valores aumentan conforme el tiempo avanza en los 6 primeros días para descender en el día 14. Esta cinética es idéntica a la obtenida cuando la densidad celular es de 16000 células (Figura 24B). Por último, con la máxima densidad celular (Figura 24C), 32000 células, se repite la cinética conforme el tiempo avanza (Resultados mostrados en Tabla Anexo 1, Anexo I).

Los valores obtenidos en constructos obtenidos empleando BM-MSCs están resumidos en la figura 25. En las tres densidades celulares se ve la misma cinética en los valores, creciendo éstos según avanza el tiempo de cultivo. La figura 25A refleja los resultados para una densidad celular de 8000 células. Los resultados para 16000 células sembradas se muestran en la figura 25B. Finalmente, los valores obtenidos cuando se emplearon 32000 células se observan en la figura 25C (Resultados mostrados en Tabla Anexo 2, Anexo I).

En los ensayos realizados con constructos formados con DP-MSCs las cinéticas obtenidas se repetían en las tres densidades celulares; ascenso de valores a medida que avanza el tiempo tal como se muestra en la figura 26. En concreto, la figura 26A muestra los valores para una densidad celular de 8000 células, la figura 26B muestra los resultados a densidad 16000 células y por último la figura 26C los valores para 32000 células sembradas en el scaffold (Resultados mostrados en Tabla Anexo 3, Anexo I).

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados con los constructos de los dos biomateriales cerámicos y los tres tipos de MSCs (Figura 27) confirman, primero, diferencias significativas entre los dos biomateriales (Figura 27A), siendo superiores los valores de β -TCP a medida que avanza el tiempo de experimento ($t=24$ horas, β -TCP=0.5000, HA=0.0568, $p=0.0246$; $t=4$ días, β -TCP=0.0872, HA=0.0459, $p<0.0001$; $t=7$ días, β -TCP=0.1144, HA=0.0690, $p=0.0021$). Basándose en origen tisular de las MSCs (Figura 27B), las diferencias significativas existentes al comienzo del ensayo desaparecen al tiempo final ($t=24$ horas, ASC=0.0323, BM-MSC=0.0363, DP-MSC=0.0699, $p<0.0001$; $t=4$ días, ASC=0.0627, BM-MSC=0.0831, DP-MSC=0.0708, $p=0.0249$; $t=7$ días, ASC=0.0748, BM-MSC=0.1131, DP-MSC=0.1029, $p=0.2141$). La figura 28 detalla los valores del ensayo *Alamar Blue* obtenidos en los diferentes tiempos para cada uno de los constructos cultivados en medio completo (Resultados mostrados en Tabla Anexo 4, Anexo I). De la misma manera, en la figura 29 los valores mostrados corresponden a la actividad celular cuantificada para cada uno de los constructos a los diferentes tiempos de la diferenciación osteogénica inducida mediante medio osteoinductivo (Resultados mostrados en Tabla Anexo 5, Anexo I).

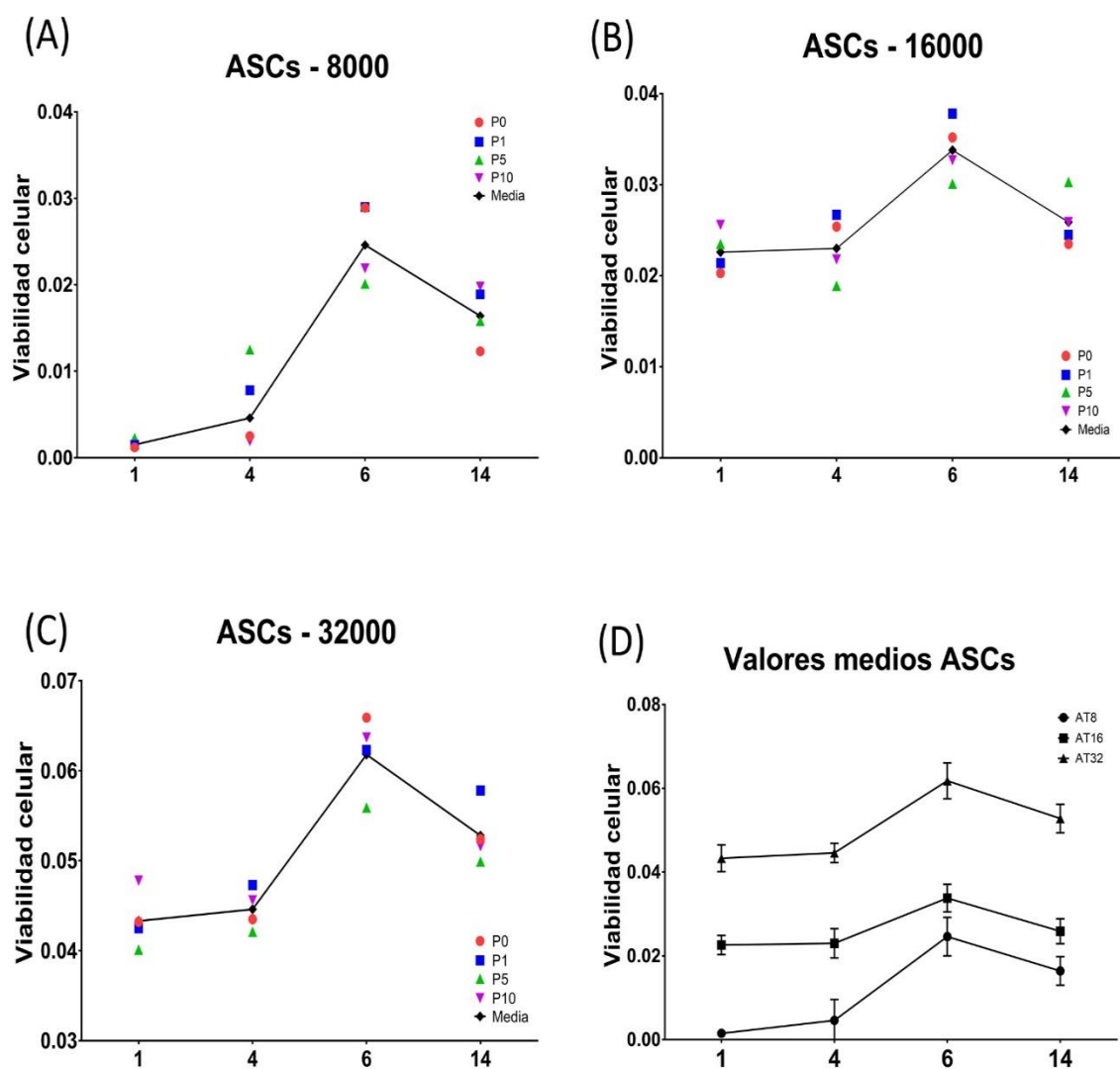


Figura 24. Resultados del ensayo Alamar Blue para ASC cultivadas sobre scaffolds de β -TCP con distintos % de porógeno (P0=0% porógeno; P1=1% porógeno; P5=5% porógeno y P10=10% porógeno). (A) Densidad óptica a 570nm a distintos tiempos para un cultivo celular de 8000 ASC (B) Densidad óptica a 570nm a distintos tiempos para un cultivo celular de 16000 ASC (C) Densidad óptica a 570nm a distintos tiempos para un cultivo celular de 32000 ASC (D) Densidad óptica a 570nm Media $\pm$ SD para las tres densidades celulares (AT8=8000 ASC; AT16=16000 ASC y AT32=32000 ASC).

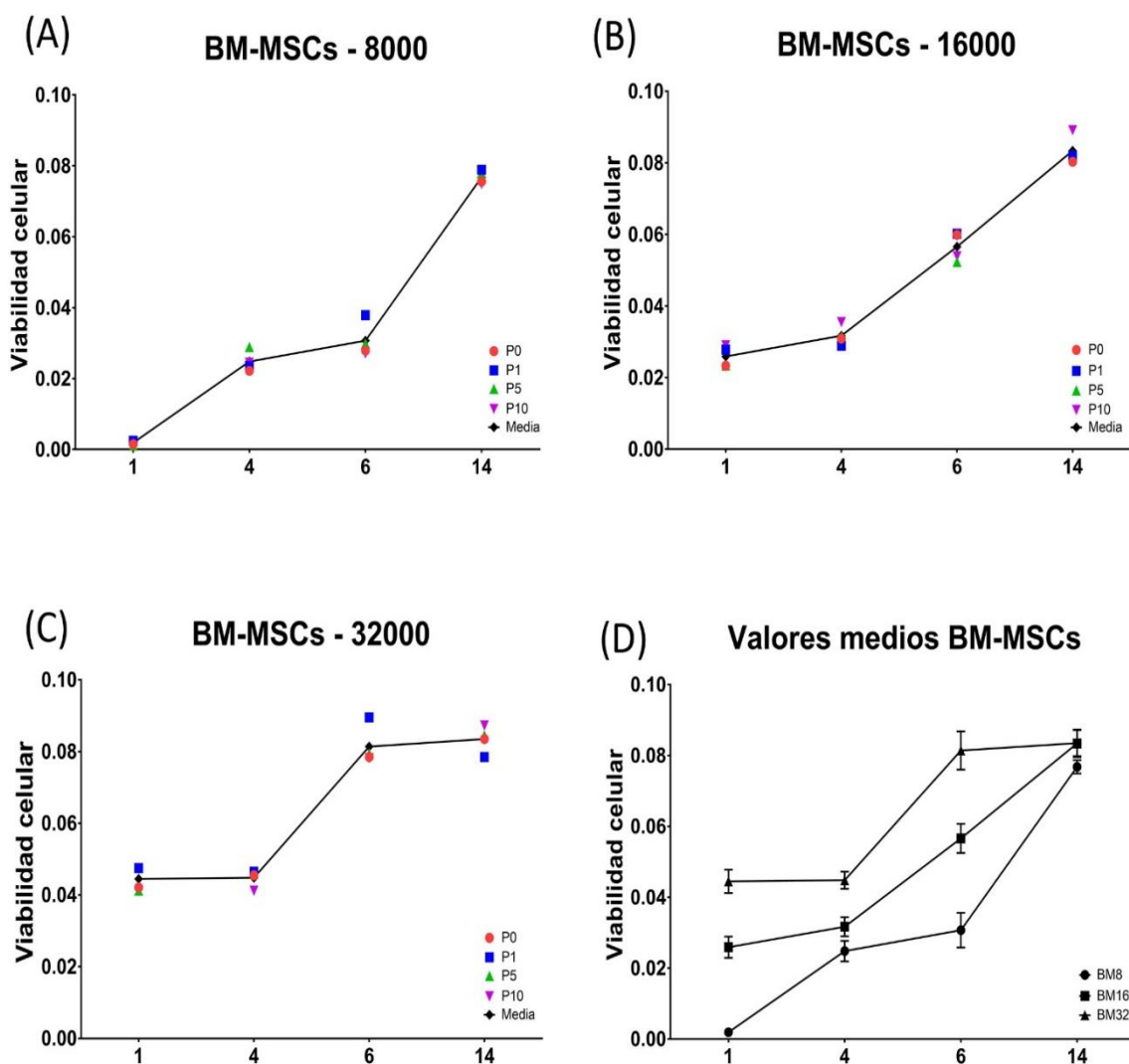


Figura 25. Resultados del ensayo Alamar Blue para BM-MSC cultivadas sobre scaffolds de β -TCP con distintos % de porógeno (P0=0% porógeno; P1=1% porógeno; P5=5% porógeno y P10=10% porógeno). (A) Densidad óptica a 570nm a distintos tiempos para un cultivo celular de 8000 BM-MSC (B) Densidad óptica a 570nm a distintos tiempos para un cultivo celular de 16000 BM-MSC (C) Densidad óptica a 570nm a distintos tiempos para un cultivo celular de 32000 BM-MSC (D) Densidad óptica a 570nm Media $\pm$ SD para las tres densidades celulares (BM8=8000 BM-MSC; BM16=16000 BM-MSC y BM32=32000 BM-MSC).

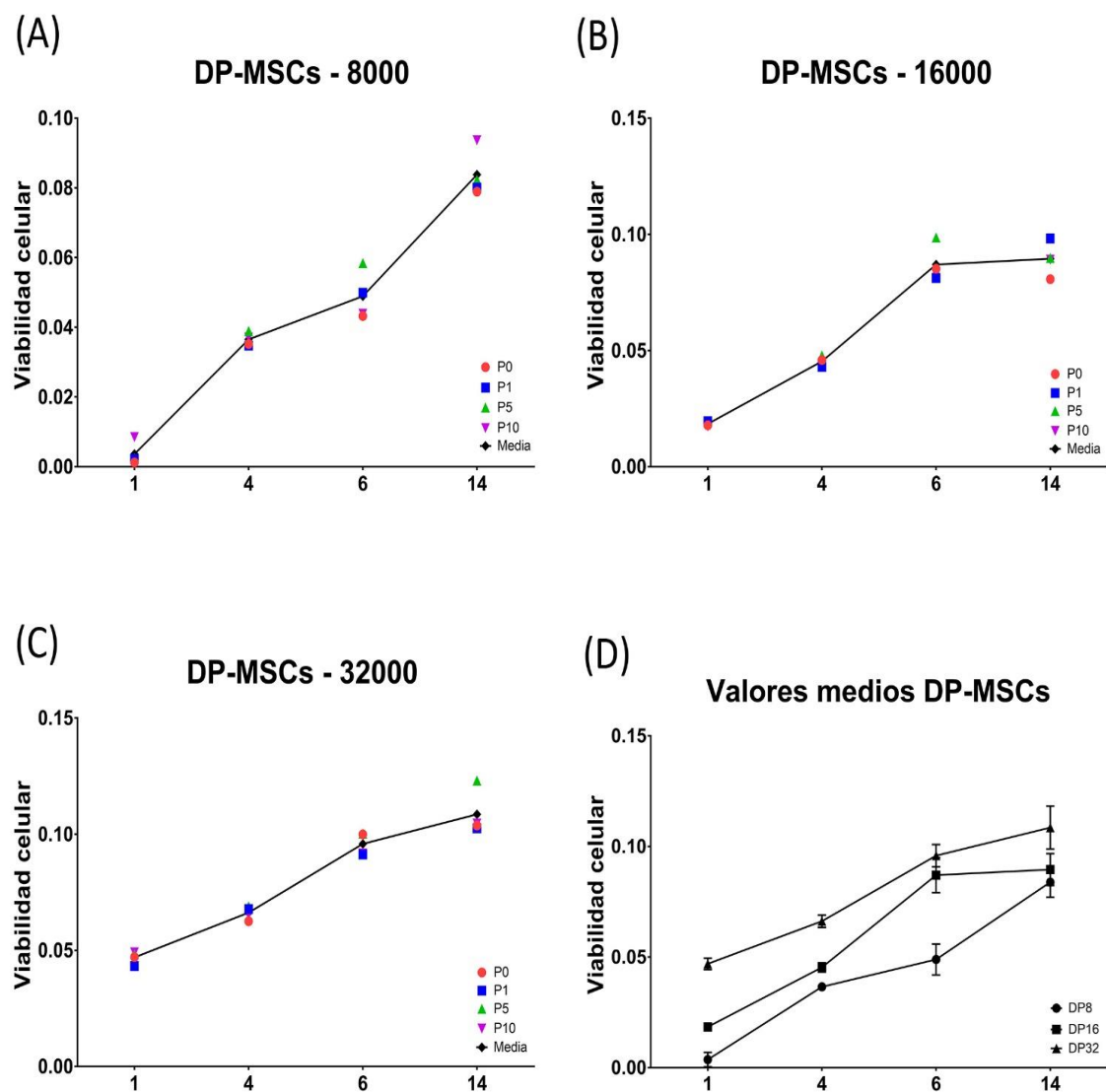


Figura 26. Resultados del ensayo Alamar Blue para DP-MSC cultivadas sobre scaffolds de β -TCP con distintos % de porógeno (P0=0% porógeno; P1=1% porógeno; P5=5% porógeno y P10=10% porógeno). (A) Densidad óptica a 570nm a distintos tiempos para un cultivo celular de 8000 DP-MSC (B) Densidad óptica a 570nm a distintos tiempos para un cultivo celular de 16000 DP-MSC (C) Densidad óptica a 570nm a distintos tiempos para un cultivo celular de 32000 DP-MSC (D) Densidad óptica a 570nm Media $\pm$ SD para las tres densidades celulares (DP8=8000 DP-MSC; DP16=16000 DP-MSC y DP32=32000 DP-MSC).

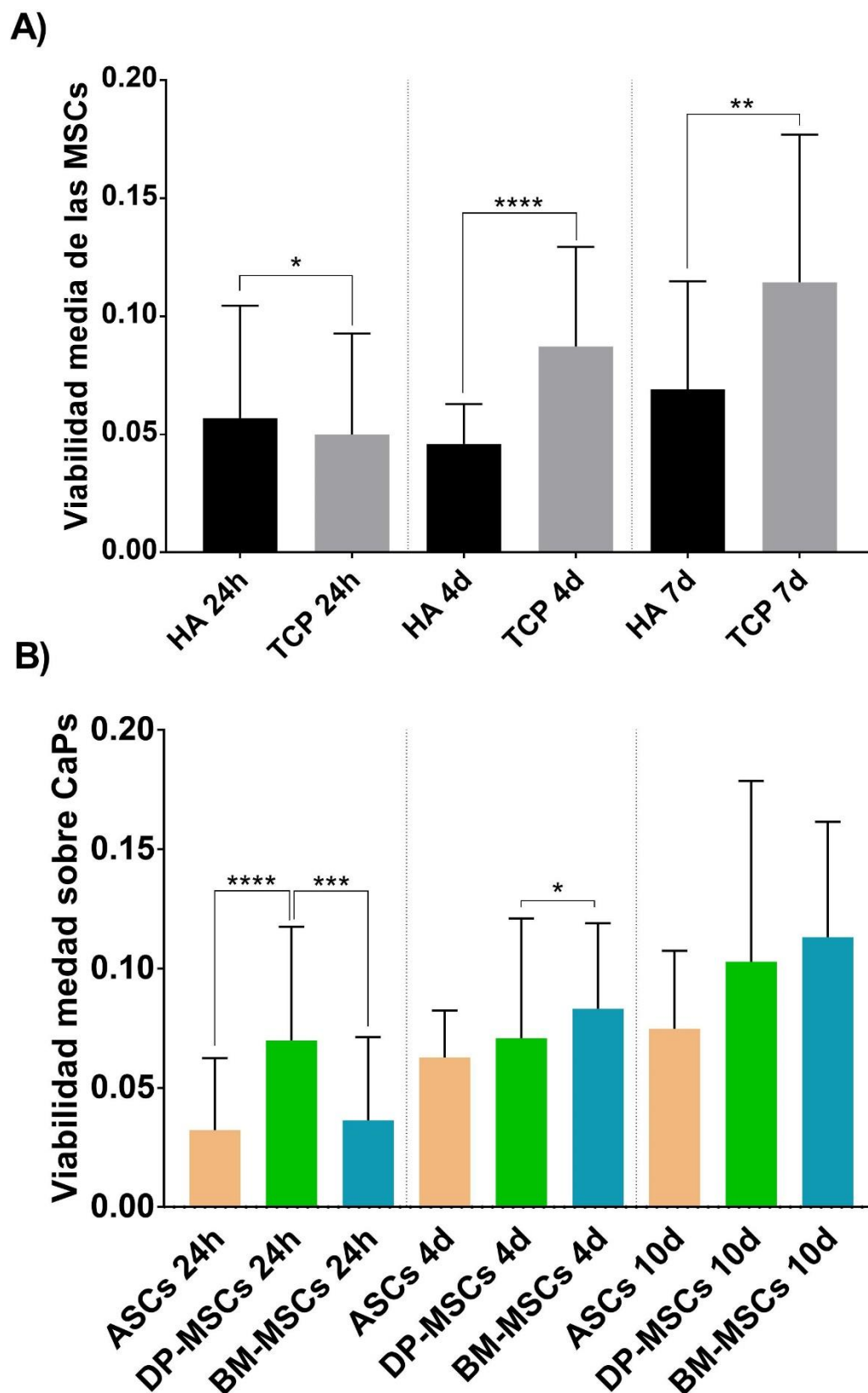


Figura 27. Resultado del ensayo Alamar Blue después de 24 horas, 4 días y 7 días de cultivo en medio completo para:

(A) Cada tipo de scaffold: HA, hidroxiapatita y β -TCP, beta-fosfato tricálcico.

(B) Cada fuente celular: ASC, tejido adiposo; DP-MSC, pulpa dental y BM-MSC, médula ósea.

Los datos se muestran en Media $\pm$ SD. Grado de significancia: * ≤ 0.05 ** ≤ 0.01 *** ≤ 0.001 **** ≤ 0.0001

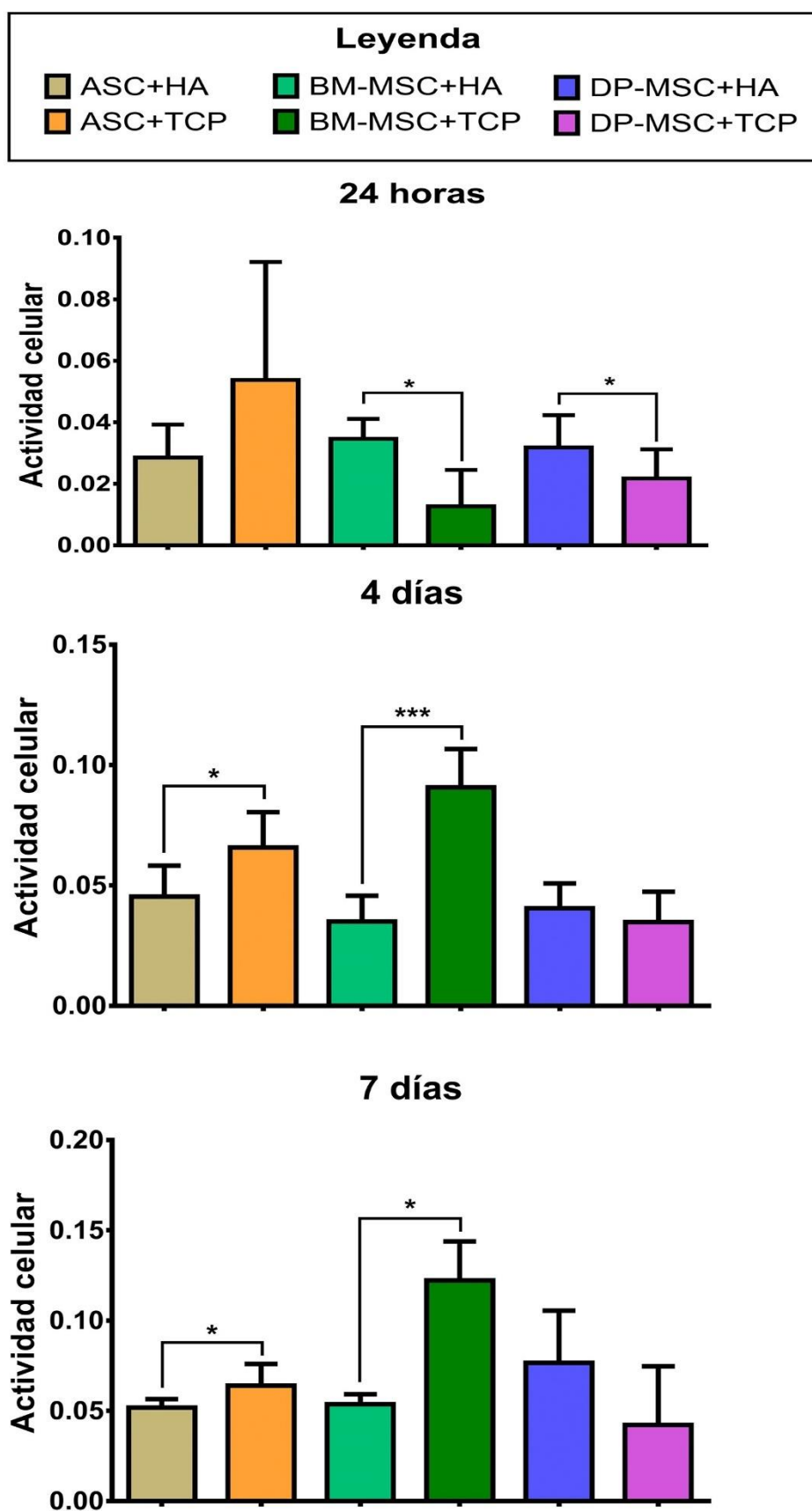


Figura 28. Resultado del ensayo Alamar Blue para cada uno de los distintos constructos después de 24 horas, 4 días y 7 días de cultivo en medio completo. Los datos se muestran en Media $\pm$ SD. Grado de significancia: * ≤ 0.05 *** ≤ 0.001 .

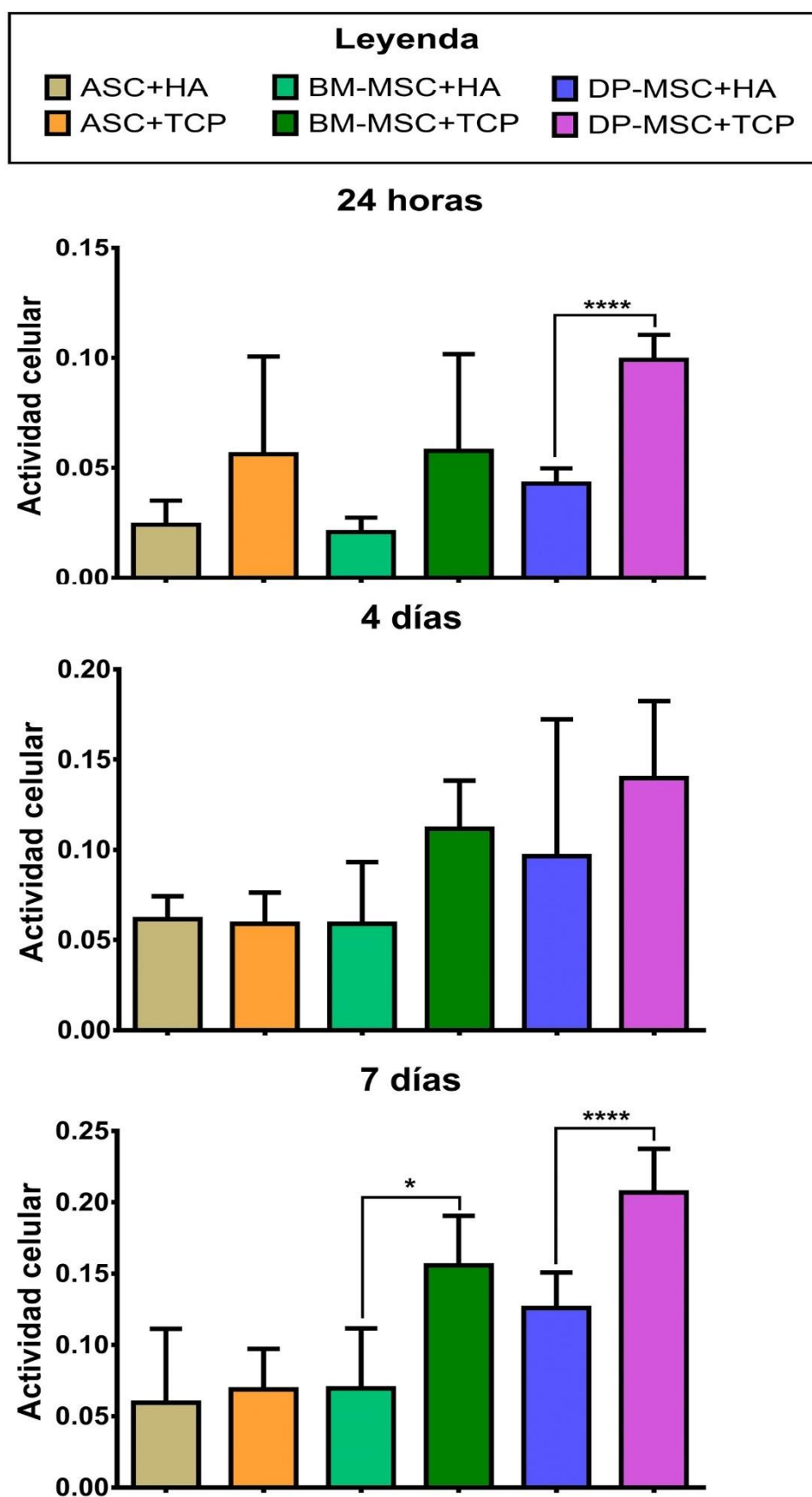


Figura 29. Resultado del ensayo Alamar Blue para cada uno de los distintos constructos después de 24 horas, 4 días y 7 días de cultivo en medio de diferenciación osteogénico. Los datos se muestran en Media±SD. Grado de significancia: * ≤ 0.05 **** ≤ 0.0001 .

Evaluación de la colonización del biomaterial y comportamiento celular

Mediante MEB se evaluó el comportamiento y morfología celular de las distintas MSCs 24 horas y días después de ser sembradas sobre *scaffolds* tanto de HA como de β -TCP. En ninguno de los constructos analizados se observó evidencia alguna de citotoxicidad; las células presentaban un tamaño y forma normal.

Sobre el *scaffold* de β -TCP (Figura 30), la adhesión celular es más rápida en BM-MSCs (Figura 30C) que en ASCs y DP-MSCs (Figura 30A y 30E, respectivamente). Tras 7 días de cultivo, sobre los *scaffolds* se observan capas celulares sin signos de toxicidad celular indistintamente del tipo de MSC sembrado (Figura 30B-D-F).

En el caso de HA (Figura 31), el proceso de adhesión fue similar para todos las MSCs (Figura 31A-C-E). A los 7 días, BM-MSCs y ASCs (Figura 31B-D) muestran un aspecto muy similar: el número de células sobre el *scaffold* ha aumentado, pero no se llega a observar una capa celular. Por el contrario, las DP-MSCs (Figura 31F) demuestran la capacidad de cubrir completamente la superficie con múltiples capas celulares. De nuevo, ningún signo o evidencia de toxicidad se observó en los constructos analizados.

Por último, imágenes específicas de los poros presentes en ambos tipos de *scaffold* (Figura 32) constatan la colonización exitosa de los poros por parte de todos las MSCs a las 24 horas de ser sembradas.

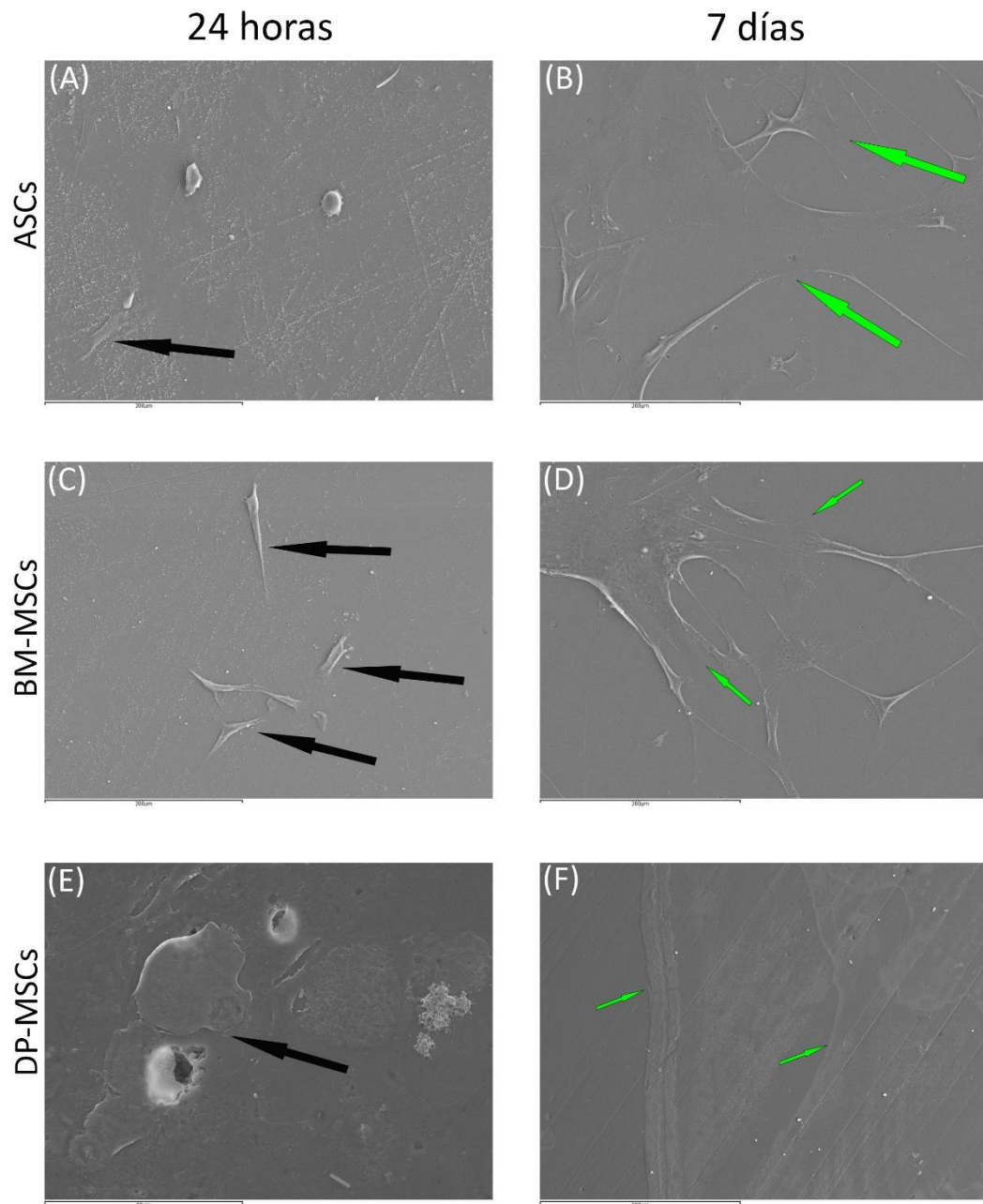


Figura 30. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido. (A) ASCs sobre scaffold de β -TCP tras 24 horas de cultivo (Escala: 200 μ m). (B) Capa celular formada por ASCs sobre scaffold de β -TCP a los 7 días de cultivo (Escala: 200 μ m). (C) BM-MSCs sobre scaffold de β -TCP tras 24 horas de cultivo (Escala: 200 μ m). (D) Capa celular formada por BM-MSCs sobre scaffold de β -TCP a los 7 días de cultivo (Escala: 200 μ m). (E) DP-MSCs sobre scaffold de β -TCP tras 24 horas de cultivo (Escala: 50 μ m). (F) Capa celular formada por DP-MSCs sobre scaffold de β -TCP a los 7 días de cultivo (Escala: 200 μ m). Las flechas negras indican células individuales. Las flechas verdes señalan capas celulares.

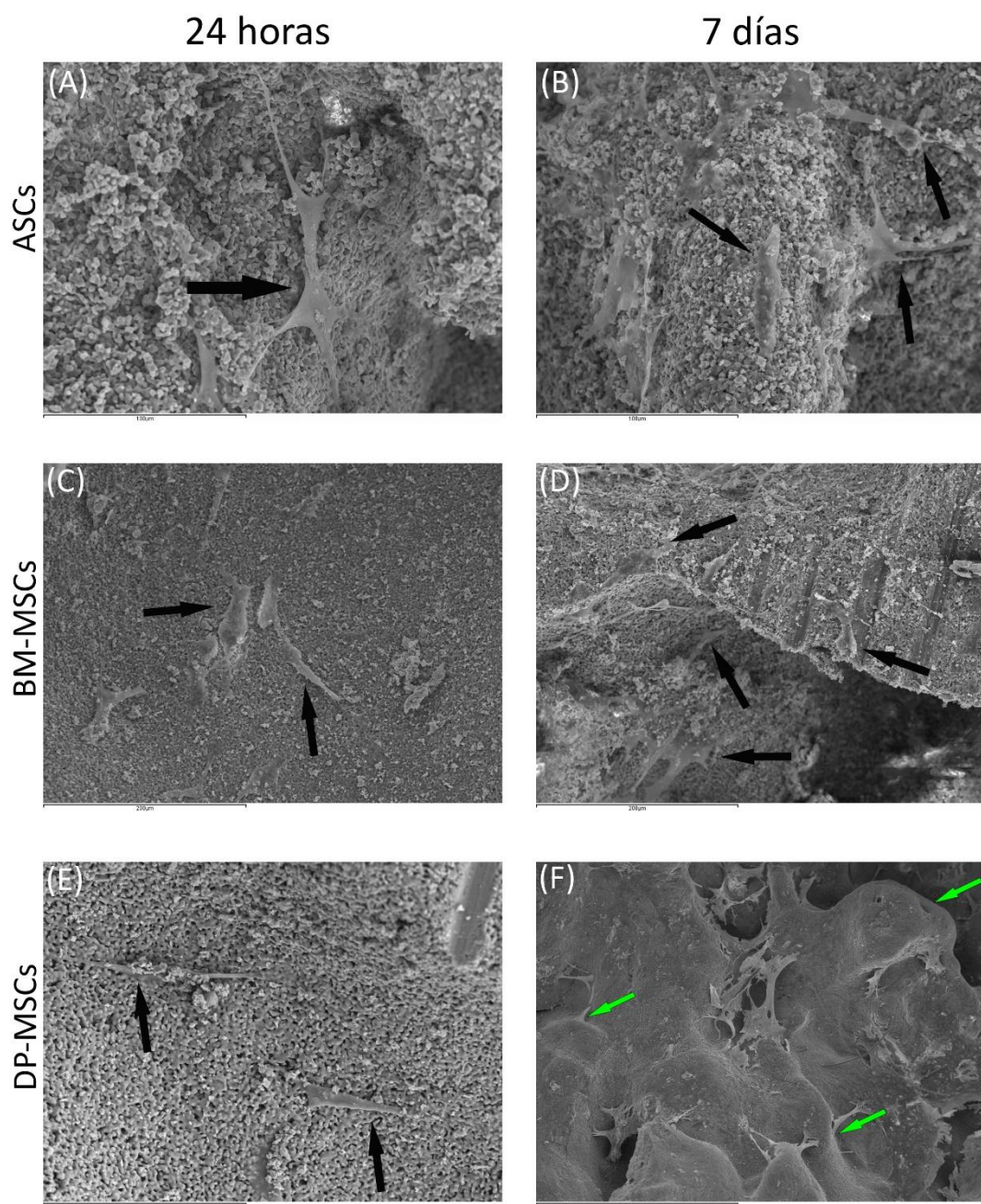


Figura 31. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido. (A) ASCs sobre scaffold de HA tras 24 horas de cultivo (Escala: 100µm). (B) ASCs sobre scaffold de HA a los 7 días de cultivo (Escala: 100µm). (C) BM-MSCs sobre scaffold de HA tras 24 horas de cultivo (Escala: 200µm). (D) BM-MSCs sobre scaffold de β -TCP a los 7 días de cultivo (Escala: 200µm). (E) DP-MSCs sobre scaffold de HA tras 24 horas de cultivo (Escala: 100µm). (F) Capa celular formada por DP-MSCs sobre scaffold de HA a los 7 días de cultivo (Escala: 1mm). Las flechas negras indican células individuales. Las flechas verdes señalan capas celulares.

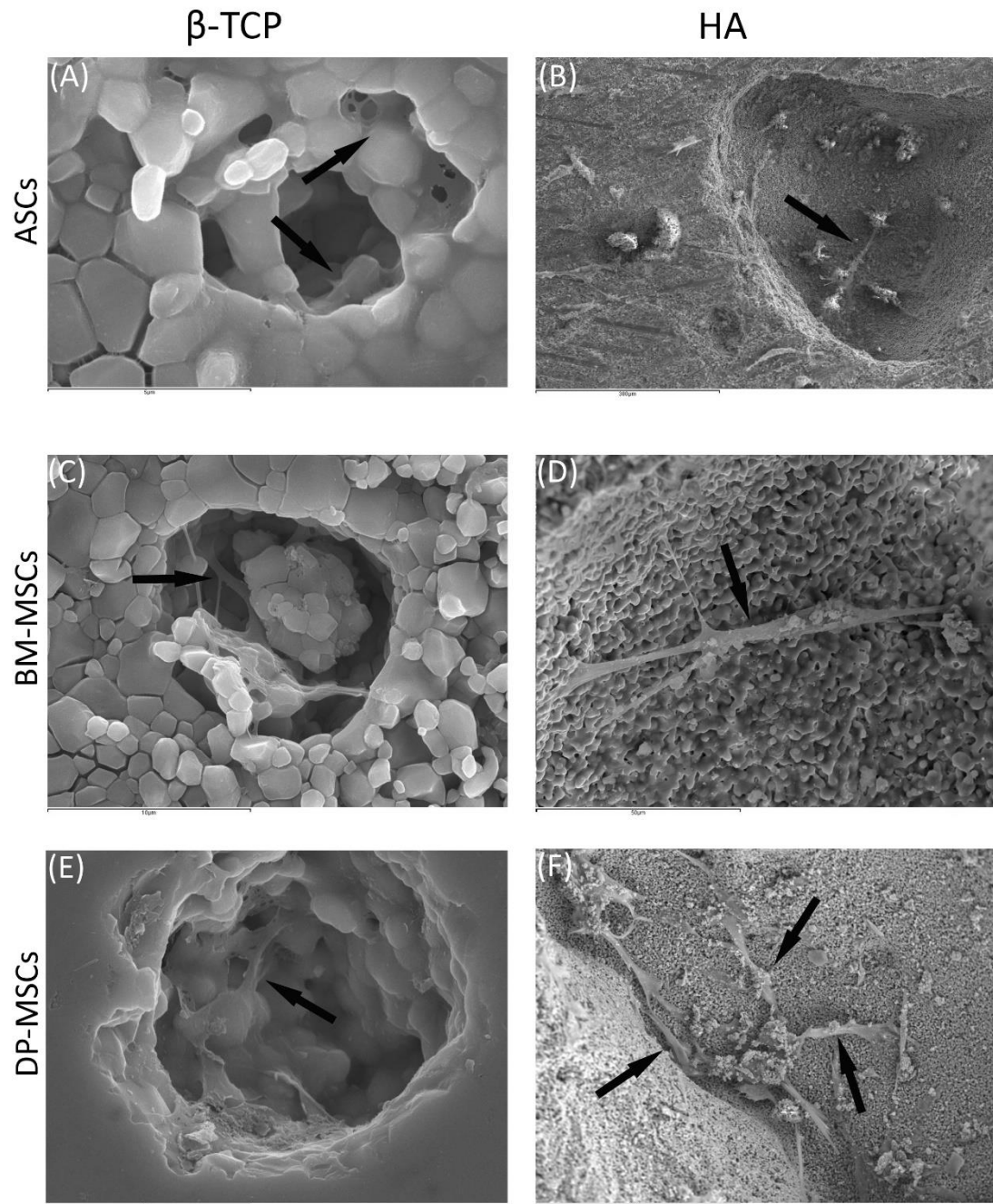


Figura 32. MSCs colonizando los poros existentes en los scaffolds tanto de HA como de β -TCP después de 24 horas de cultivo. (A) Poro de β -TCP colonizado por ASCs (Escala: 5 μ m). (B) Poro en scaffold de HA colonizado por ASCs (Escala: 300 μ m). (C) Poro de β -TCP colonizado por BM-MSCs (Escala: 10 μ m). (D) Poro en scaffold de HA colonizado por BM-MSCs (Escala: 200 μ m). (E) Poro de β -TCP colonizado por DP-MSCs (Escala: 10 μ m). (F) Poro en scaffold de HA colonizado por DP-MSCs (Escala: 200 μ m). Las flechas negras indican células individuales.

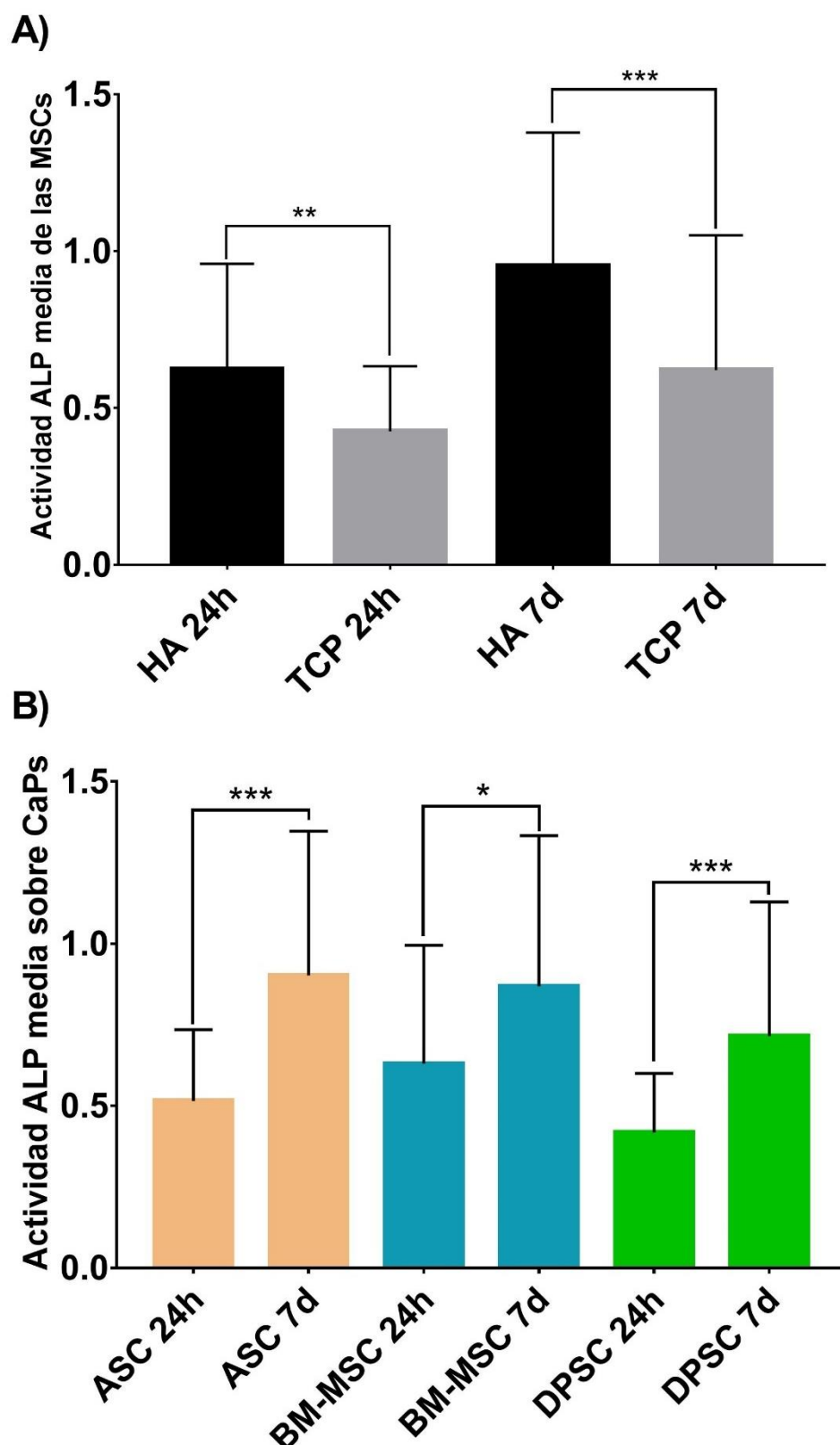


Figura 33. Resultados del test de actividad de ALP después de 24 horas y 7 días de cultivo en medio de diferenciación osteogénico para:

(A) Cada tipo de scaffold: HA, hidroxiapatita y β -TCP, beta-fosfato tricálcico.

(B) Cada fuente celular: ASC, tejido adiposo; DP-MSC, pulpa dental y BM-MSC, médula ósea.

Los datos se muestran en Media $\pm$ SD. Grado de significancia: * ≤ 0.05 ** ≤ 0.01 *** ≤ 0.001

Actividad ALP

Los resultados del ensayo colorímetro para cuantificar la actividad de la ALP referidos al *scaffold* y a la localización celular están reflejados en la Figura 33. En el caso del *scaffold* empleado (Figura 33A), los valores de HA son significativamente superiores a los de β -TCP en ambos tiempos ($t=24$ horas, β -TCP=0.4249, HA=0.6213, $p=0.0014$; $t=7$ días, β -TCP=0.6201, HA=0.9517, $p=0.0002$). De acuerdo con la localización celular (Figura 33B), mientras la actividad ALP aumenta significativamente durante el experimento para cada una de ellas (ASC, $t_1=0.515$, $t_2=0.9060$, $p=0.0007$; BM-MSC, $t_1=0.6293$, $t_2=0.8686$, $p=0.0358$; DP-MSC, $t_1=0.417$, $t_2=0.7147$, $p=0.0002$), las diferencias existentes al comienzo del experimento desaparecen al tiempo final ($t=24$ horas, ASC=0.5150, BM-MSC=0.6293, DP-MSC=0.4170, $p=0.0306$; $t=7$ días, ASC=0.9016, BM-MSC=0.8636, DP-MSC=0.7147, $p=0.2394$). Los datos específicos para cada uno de los constructos a tiempo final del experimento se muestran en la figura 34.

Se calculó y analizó el crecimiento de la actividad ALP en términos porcentuales (Figura 35). DP-MSCs presentan el crecimiento más grande entre los distintos tipos celular (ASC=62.49, BM-MSC=40.89%, DP-MSC=68.62%, $p=0.4202$) y el constructo con el mayor aumento porcentual es DP-MSC+HA, aunque estas diferencias son cuantitativas pero no estadísticamente significativas (ASC+HA=98.60%, BM-MSC+HA=43.46%, DP-MSC+HA=132.2%, ASC+ β -TCP=78.38%, BM-MSC+ β -TCP=112.2%, DP-MSC+ β -TCP=56.44%, $p=0.1479$).

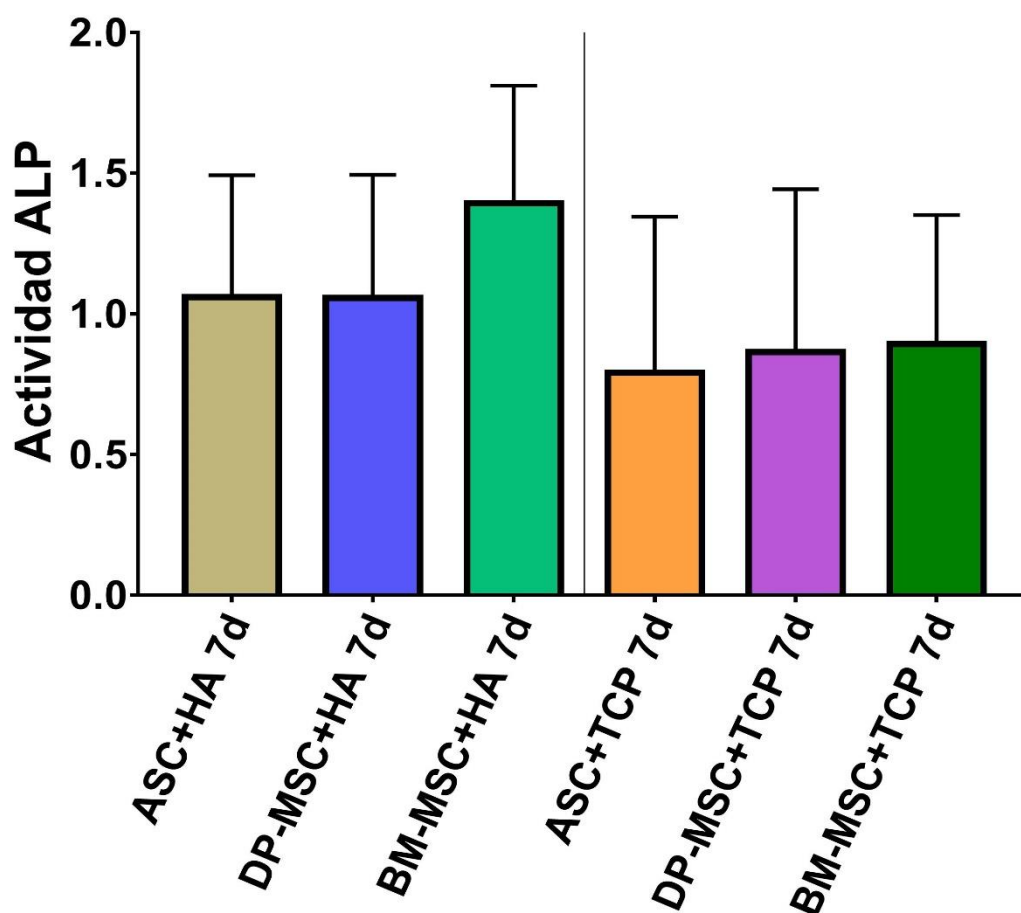


Figura 34. Resultados del test de actividad de ALP para cada constructo analizado a los 7 días de cultivo en medio de diferenciación osteogénico. Los datos se muestran en Media $\pm$ SD.

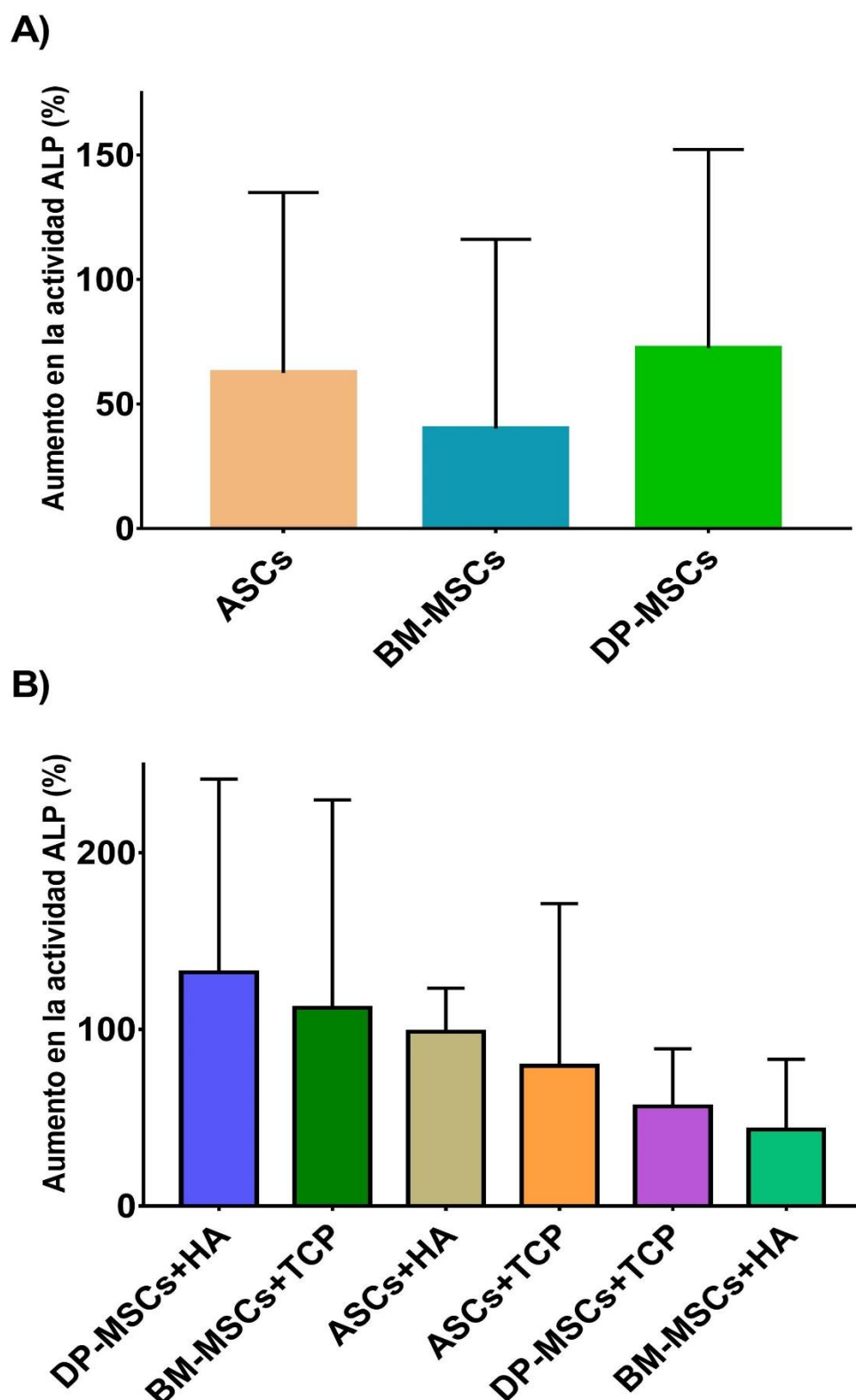


Figura 35. Incremento de la actividad ALP, en %, del t1 al t2 para:

(A) Cada fuente celular: ASC, tejido adiposo; DP-MSC, pulpa dental y BM-MSC, médula ósea.

(B) Cada constructo analizado: HA, hidroxiapatita y β -TCP, beta-fosfato tricálcico.

Los datos se muestran en Media $\pm$ SD.

DISCUSIÓN

El área de la ingeniería de tejidos y de la medicina regenerativa ha acaparado un creciente interés en los últimos años que han permitido lograr avances importantes en la mejora de la calidad de vida de pacientes con diferentes patologías. Sin embargo, no se ha logrado aún alcanzar el completo potencial terapéutico de este conjunto de técnicas. Diferentes aspectos de los procesos biológicos implicados en la regeneración y restauración quedan aún por esclarecer, incluyendo aspectos intrínsecos a las propias células y extrínsecos, como la posible influencia, sobre el potencial regenerativo, del uso de diferentes biomateriales.

En el contexto de la regeneración ósea, el uso combinado de MSCs, células osteoprogenitoras, con biomateriales que permitan y potencien la osteogénesis, como las biocerámicas es la estrategia más prometedora a medio plazo. Sin embargo, el término MSCs, entendidas como células pluripotenciales, es demasiado genérico y determinados matices pasados por alto pueden determinar en gran medida su mayor o menor aplicabilidad en la estrategia regenerativa. Así, es de gran importancia comprender cómo la localización anatómica o microambiente del que procede las MSCs imprime un mayor o menor compromiso en el linaje y si éste restringe su potencialidad. De igual modo, en el caso de la aplicación combinada de MSCs y biomateriales, es necesario determinar si ocurre, y en qué medida, una posible afectación sobre su potencial osteogénico. En este contexto, existen distintos estudios que han comparado el potencial osteogénico *in vitro* de MSCs aisladas de distintas localizaciones anatómicas (Tabla 7); no obstante, la importancia de la fuente de origen de las MSCs utilizadas y su uso combinado con diferentes biomateriales no ha sido completamente aclarado. Este tipo de estudios dista de ser trivial ya que pretende maximizar el potencial osteogénico de las MSCs para lograr una regeneración ósea más efectiva. En este contexto, la presente tesis doctoral pretende completar de alguna manera los estudios previos, determinando qué fuente de MSCs, biocerámica y combinación MSC-biocerámica presenta un mayor potencial osteogénico. Desde nuestro conocimiento, se trata del primer estudio comparativo que analiza el potencial osteogénico de MSCs humanas aisladas de médula ósea, tejido adiposo y pulpa dental (los tipos de MSCs que más atención han recibido recientemente), cultivadas tanto en plástico como en las CaPs más empleadas en regeneración ósea: β -TCP and HA.

La hipótesis de partida de esta tesis doctoral surgió del análisis de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio a raíz de un análisis proteómico comparativo mediante la técnica iTRAQ. El objetivo de este análisis era identificar la posible existencia de un perfil de expresión proteómico que pudiese diferenciar a las MSCs aisladas de distintas localizaciones articulares (hueso y cartílago). Los resultados obtenidos ratificaron de cierta forma que, en efecto, el origen anatómico de las MSCs (que en este caso era muy próximo) imprimía un compromiso de linaje en las MSCs. Se identificaron 50 proteínas (Tabla 6), de las cuales 5 habían sido asociadas con la diferenciación osteogénica con anterioridad: FLNA, GRP78 y PALLD con una expresión elevada mientras que DSTN e IBP3 presentaban una expresión disminuida en las MSCs de hueso respecto a las MSCs de cartílago. En su trabajo con BM-MSCs humanas en el que analizaban su comportamiento mecánico durante la diferenciación osteogénica y adipogénica, Yu *et al.* demostraron que la expresión de FLNA aumentaba 3.5 veces durante la diferenciación osteogénica (H. Yu et al., 2010), posibilitando un citoesqueleto y microtúbulos de actina desarrollados que podrían promover la osteogénesis (Meyers, Zayzafoon, Douglas, & McDonald, 2005). GRP78 es una proteína de membrana necesaria para la endocitosis de DMP1, molécula reguladora de la diferenciación osteogénica que es transportada al núcleo durante el desarrollo óseo y dental (Ravindran et al., 2008). En su estudio de expresión de miRNAs en cultivos celulares a los que se había inducido la diferenciación osteogénica, Eguchi *et al.* observaron que en los cultivos con estimulación osteogénica se veía inducida la expresión de GRP78 en las fases

iniciales de la diferenciación (T. Eguchi et al., 2013). Recientemente, Li *et al.* comunicaron que la expresión de varios genes, entre ellos *GRP78*, aumentaba en condiciones de inducción osteogénica de células del ligamiento periodontal en su estudio sobre si el estrés del retículo endoplasmático estaba implicado de alguna manera en la diferenciación osteogénica (Li, Wen, Jiang, & Zhu, 2017). La última de las proteínas con una abundancia mayor, PALLD, es una proteína asociada a la actina implicada en la organización y estabilidad del citoesqueleto (Artelt et al., 2018) cuya expresión se demostró elevada durante la diferenciación osteogénica en un estudio que analizaba el papel que el citoesqueleto o proteínas asociadas podrían tener en la diferenciación osteogénica de ASCs humanas (Wall, Rachlin, Otey, & Lobo, 2007). DSTN es una proteína con expresión ubicua en el cuerpo humano que corta los filamentos de actina (actina F) y se une a los monómeros de actina (actina G), por lo que impide su polimerización (Ghosh, 2004; Vartiainen et al., 2002); en BM-MSCs se ha descrito que al inhibir la DSTN se potencia la diferenciación de osteoblastos y la formación de hueso (Chen et al., 2015). Por último, IBP3 es una glicoproteína producida en el hígado que actúa como estabilizador, transportador y liberador de la IGF-1 (Jogie-Brahim, Feldman, & Oh, 2009); se ha descrito como molécula antagonista de BMP-2 en un modelo de pez cebra (Zhong et al., 2011) y, recientemente, un estudio empleando BM-MSCs de origen murino ha demostrado que la IBP3 disminuye la expresión de marcadores de la diferenciación osteogénica a través de la vía de señalización de BMP-2 (K. Eguchi et al., 2018).

Con estos antecedentes se plantea la hipótesis, que complementa la hipótesis inicial de que el potencial osteogénico de las MSCs está influido por el tejido de origen de éstas, de que una proximidad anatómica de las MSCs al hueso tiene un efecto directo sobre su fenotipo, en forma de un mayor compromiso osteogénico. La confirmación de esta hipótesis se realizó determinando experimentalmente si en efecto existía un mayor potencial osteogénico de MSCs procedentes de tres tejidos diferentes: la médula ósea, el tejido adiposo y la pulpa dental.

En 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular publicó los criterios mínimos para que una célula fuera definida como MSC (Dominici et al., 2006), unificando así su caracterización para la comunidad científica. Por lo tanto, en nuestro estudio la primera fase consistió en determinar el cumplimiento de estos criterios de caracterización fenotípica; basada en la presencia o ausencia de marcadores de superficie específicos y el potencial de diferenciación de las células aisladas a osteoblastos, adipocitos y condroblastos. Los resultados obtenidos en la citometría de flujo para analizar los marcadores de superficie celulares (Figura 20) y las tinciones específicas para evaluar el potencial de diferenciación en los tres linajes (Figura 21) confirman que las células empleadas en los ensayos de esta tesis se ajustan a la definición de MSC.

Tabla 7

Estudios realizados en los que se comparan los potenciales osteogénicos de MSCs aisladas de distintas localizaciones anatómicas.

Año	Superficie	Origen MSCs	MSCs comerciales	Autor
2013	Plástico	Médula ósea Pulpa dental Ligamiento periodontal Papila apical	NO	Tamaki <i>et al.</i>
2015	Plástico	Tejido adiposo Médula ósea	NO	Li <i>et al.</i>
2015	Biocerámica (HA/ β -TCP)	Médula ósea Tejido adiposo Pulpa dental	Sí	Lobo <i>et al.</i>
2016	Plástico	Pulpa dental Cordón umbilical Sangre menstrual	NO	Ren <i>et al.</i>
2017	Plástico	Pulpa dental Tejido adiposo	Sí	D'Alimonte <i>et al.</i>
2018	Plástico	Médula ósea Tejido adiposo Cordón umbilical Pulpa dental Ligamiento periodontal Diente de leche Encía	NO	Zhang <i>et al.</i>

Si bien la caracterización fenotípica estandariza las condiciones experimentales, en el sentido de utilizar células *a priori* similares, era necesario determinar si las diferentes poblaciones estudiadas diferían en sus propiedades de proliferación y capacidad osteogénica. Estos estudios se realizaron sembrando las MSCs sembradas superficies de plástico. Se evaluaron su tasa de proliferación, medida como días necesarios para duplicar el número celular, y también se determinó su potencial osteogénico. Los resultados mostraban que la mayor tasa de proliferación era una característica diferencial de las DP-MSCs respecto a BM-MSCs y ASCs (Figura 22). Éstas presentaban un tiempo de duplicación menor, que a efectos prácticos se traducía en una tasa de duplicación de la población entre 5 y 6 veces más rápida que las otras dos poblaciones estudiadas, cuya tasa de crecimiento era similar. Estos resultados son concordantes con los mostrados por anteriores estudios comparativos de MSCs aisladas de distintas localizaciones anatómicas (Tamaki, Nakahara, Ishikawa, & Sato, 2013; Zhang *et al.*, 2018). Otra observación realizada durante el mantenimiento de los cultivos celulares es que las DP-MSCs presentan un tamaño inferior a las BM-MSCs y las ASCs. Al presentar una tasa de proliferación más elevada que las otras MSCs, y tratándose de células en un estadio igual o muy similar de diferenciación, es concebible que el tamaño inferior observado en DP-MSCs sea consecuencia de ésta ya que existe una relación indirecta entre proliferación y tamaño celular (Björklund, 2019; Lloyd, 2013).

Para evaluar el potencial osteogénico de las MSCs se realizó la tinción con Rojo Alizarina cuantificando, en términos porcentuales, la superficie de cultivo teñida para cada una de las MSCs. El uso del Rojo Alizarina sirve para identificar depósitos de calcio, un proceso que ocurre al comienzo de la mineralización de la matriz ósea, al reaccionar específicamente con cationes Ca^{++} . Se trata de un método clásico (Puchtler, Meloan, & Terry, 1969) que aún tiene vigencia como método de referencia pese a que se han desarrollado nuevos métodos para sustituirlo (Wang, Liu, Maye, & Rowe, 2006). Las imágenes obtenidas por microscopía de los cultivos (Figura 23A-C) evidencian una mayor intensidad de la tinción en las DP-MSCs, seguidas de las BM-MSCs y las ASCs aparecen como las MSCs con menor potencial osteogénico. La cuantificación (Figura 23D) evidenció las diferencias significativas entre las intensidades obtenidas para cada tipo de MSC. Esta pauta de tinción está en sintonía con la obtenida por Tamaki *et al.* (2013) y la amplía ya que en su trabajo comparó BM-MSCs con DP-MSCs. Se ha comunicado que los cultivos de DP-MSCs en pasajes altos pierden potencialidad y sólo pueden diferenciarse en el linaje osteoblástico (J. Yu *et al.*, 2010) y, más recientemente, Ren *et al.* propusieron que las DP-MSCs probablemente presenten una ventaja respecto a otros tipos de MSCs para la diferenciación osteogénica (Ren *et al.*, 2016). Dado que el odontoblasto y el osteoblastos comparten reguladores, inmunofenotipo y proteínas de matriz (S. Gronthos, Mankani, Brahimi, Robey, & Shi, 2000; Nakashima, Nagasawa, Yamada, & Reddi, 1994), el mayor potencial osteogénico que muestran DP-MSCs puede ser consecuencia de un posible compromiso con el proceso odontoblástico (Huang, Gronthos, & Shi, 2009).

En la parte final de la tesis doctoral, los ensayos se realizaron empleando constructos de MSCs cultivadas sobre *scaffolds* biocerámicos, dado que la naturaleza del biomaterial puede ejercer distintos efectos sobre las células. Así, se determinó la biocompatibilidad de los mismos comprobando la viabilidad celular a diferentes tiempos de cultivo y porosidad del biomaterial, así como la capacidad de colonizar el biomaterial. La viabilidad se determinó en función de la actividad metabólica, mediante un colorante vital, utilizando el reactivo AlamarBlue™; la colonización del biomaterial, la adhesión y organización celular mediante MEB. Por último, el compromiso osteogénico, o la mayor o menor capacidad osteogénica, se determinó en cada caso cuantificando la actividad ALP.

Para analizar el efecto de la porosidad en las MSCs, se determinó la viabilidad celular a diferentes tiempos de cultivo en función de la porosidad del *scaffold* de β -TCP. Además, entre las variables estaba incluido un número de siembra diferente, como un posible factor a tener en cuenta; esto es, una densidad poblacional que pudiese afectar en diferente grado. Los resultados (Figuras 25-27) muestran, como era esperable, que para todos los constructos cuanto mayor era la densidad celular inicial cultivada mayor es la viabilidad celular obtenida en todos los tiempos del ensayo medidos (Figuras 25D, 26D y 27D). Respecto al tiempo de cultivo, se aprecia que los valores aumentan según éste aumenta lo que es indicativo de que los *scaffolds* son biocompatibles. Para todas las condiciones los valores para las DP-MSCs son los más altos (Figura 26) mientras que las ASCs presenta los valores más bajos (Figura 24). Respecto a la porosidad del material, las diferencias existentes para un mismo tipo de MSC y tiempo de experimento eran inferiores al 10%. En resumen, las diferencias observadas en este ensayo no eran importantes y parecían independientes de la porosidad. Por ello, en los siguientes ensayos se decidió emplear *scaffolds* de idéntica porosidad con una densidad celular de 3×10^4 células/cm² como describieron Lobo *et al.* (2015).

Una vez obtenidos los nuevos constructos, tanto de β -TCP como de HA, las imágenes de MEB (Figuras 31 y 32) revelaron que las tasas de proliferación obtenidas en plástico (Figura 22)

parecen mantenerse ya que las DP-MSCs formaron una capa celular completa en ambas CaPs 7 días después de realizarse la siembra mientras que las BM-MSCs y ASCs, pese a adherirse a ambas CaPs, sólo formaron la capa celular en el scaffold de β -TCP. Las CaPs presentan una porosidad por lo que, si se quiere lograr una óptima colonización por parte de las células, éstas han de ser capaz de colonizar correctamente estos poros. Al analizar los constructos por MEB, se obtuvieron imágenes específicas de los poros existentes en ambas CaPs (Figura 32) que prueban una colonización de poros evidente por todas las MSCs tras 24 horas de cultivo. Estas observaciones concuerdan con los resultados que obtuvieron Lobo *et al.* en su estudio comparativo entre DP-MSCs extraídas de pacientes, BM-MSCs y ASCs de líneas celulares comerciales de las cuales únicamente DP-MSCs generaron una capa celular completa en el biomaterial (Lobo *et al.*, 2015). Estos resultados demuestran que las DP-MSCs son las MSCs con una mayor capacidad para colonizar diferentes biomateriales, especialmente biocerámicos, posiblemente debido a que su menor tamaño y mayor tasa de proliferación permiten una mejor colonización de los poros existentes y la formación de capas celulares completas.

En lo referente a viabilidad/actividad celular, en las figuras 28 y 29 se muestran los resultados del reactivo AlamarBlue™. Analizando de manera específica las CaPs (Figura 27A) se observa que a medida que pasan los días β -TCP presenta una mayor viabilidad que HA. Las MSCs de cada localización anatómica (Figura 27B) presentan un aumento de los valores según el experimento avanza, siendo en el tiempo inicial los valores más altos los de DP-MSCs y a tiempo final no existe ninguna diferencia significativa entre ellas. Los valores obtenidos son coherentes con las imágenes de MEB (Figuras 31 y 32) ya que en éstas se demuestra que sólo las DP-MSCs desarrollaron la capa de células en los scaffolds de HA mientras que en los de β -TCP lo hicieron los tres tipos de MSCs. Al analizar el comportamiento de cada constructo (Figura 28) se observa que las DP-MSCs presentan sus valores más altos en HA, mientras que tanto las BM-MSCs como las ASCs obtienen sus valores superiores en β -TCP. Esta actividad celular diferencial de las MSCs en función de la CaP utilizada es ratificada por la MEB, estableciendo que las DP-MSCs tienen la mayor actividad celular en HA, al ser la CaP donde mayor es la capa celular que forman, mientras que las BM-MSC y las ASC la presentan en β -TCP, única CaP en la que han formado una capa celular completa. Por último, la ausencia de signos de citotoxicidad en las células adheridas a ambas CaPs (Figuras 31-33) evidencian la biocompatibilidad de β -TCP e HA. Tomados en conjunto, estos resultados confirman que ambas CaPs no comprometen la viabilidad de las MSCs que crecen sobre su superficie y poros para acabar colonizándolas y, aún más importante, arrojan evidencias de un comportamiento diferencial de las MSCs en términos de actividad celular según sea su localización anatómica de origen y la CaP con la que interactúa.

El establecimiento de la osteogénesis de los constructos se evaluó monitorizando la actividad ALP. En la literatura está descrito que este enzima aumenta su expresión en la fase inicial de la osteogénesis (Stan Gronthos *et al.*, 1999) por lo que está considerada como un marcador válido de osteogénesis (Golub & Boesze-Battaglia, 2007) e incluso se ha considerado como molécula predictora de la capacidad de formación ósea en BM-MSCs (Prins *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos para las CaPs (Figura 33A) muestran que, a lo largo de todo el experimento, HA destaca como la más osteoinductora al obtener valores más altos que β -TCP. Estos resultados difieren con los obtenidos en el ensayo con AlamarBlue™ (Figura 27A) que mostraban a β -TCP como la mejor CaP en términos de viabilidad celular. La mayor diferencia en la actividad ALP entre las CaPs se da en el día 7 y es consecuencia de que los 3 tipos de MSCs presentan en ese tiempo mayor actividad ALP en HA que en β -TCP (Figura 34). En cuanto a las MSCs (Figura 33B), todas presentan un aumento significativo al final del ensayo respecto al inicio. A tiempo final, BM-MSCs y ASCs muestran valores absolutos muy similares y ligeramente superiores a DP-MSCs,

sin existir significancia en ninguna de las diferencias. Este patrón en la actividad de ALP coincide con el obtenido en recientes estudios comparativos de MSCs de distintos orígenes sembradas en plástico (D'Alimonte et al., 2017; Zhang et al., 2018) aunque en ellos las diferencias que obtuvieron fueron significativas. Una explicación plausible de la ausencia de significación en los resultados obtenidos en este trabajo puede ser el hecho de haber usado *scaffolds* de β -TCP y HA en vez de plástico como superficie de cultivo ya que estas CaPs poseen propiedades osteoinductoras (Thorpe, Creasey, Sammon, & Le Maitre, 2016; Tsukanaka, Fujibayashi, Otsuki, Takemoto, & Matsuda, 2015). Los resultados de la actividad celular durante la osteogénesis inducida (Figura 29) muestran que las DP-MSCs presentan valores más altos en ambas CaPs que BM-MSCs y ASCs en todos los puntos del ensayo; basado en esto, se hipotetiza que el efecto osteoinductor de las CaPs podría ser mayor en las DP-MSCs que en las otras MSCs. Para confirmar esta hipótesis sería necesario realizar un estudio comparativo específico. El aumento de la actividad ALP en términos relativos (% de aumento de tiempo inicial a tiempo final del ensayo) de las MSCs y los constructos muestran una tendencia ya que las diferencias son cuantitativas, pero no significativas. Las MSCs con el aumento más robusto en la actividad ALP son las DP-MSCs (Figura 35A) y en los constructos, las DP-MSCs sembradas sobre HA presentan el mayor aumento de las 6 combinaciones (Figura 35B); además, se aprecia una influencia de las CaPs este aumento: las DP-MSCs presentan un mayor crecimiento en HA, BM-MSCs obtienen su máximo crecimiento cultivadas sobre β -TCP y ASCs se presentan como las MSCs menos afectadas por la CaP en la que son cultivadas.

La falta de significancia en los últimos ensayos de esta tesis doctoral probablemente se deba a las limitaciones del estudio. Es esperable que las tendencias obtenidas sean confirmadas con un tamaño de muestra mayor pero el número de biomateriales disponible era limitado. Esta limitación en el número de biomateriales también afectó en el diseño experimental y la duración establecida para evaluar el compromiso osteogénico podría ser insuficiente para una óptima detección del proceso osteogénico establecido por las MSCs; un ensayo de evaluación del compromiso osteogénico con mayor duración, como el que fue realizado por D'Alimonte *et al.* en el que mantuvieron los cultivos hasta los 28 días (D'Alimonte et al., 2017), podría aumentar la significancia de las diferencias obtenidas. Cuando las BM-MSCs completan la diferenciación osteogénica, se localizan en su interior depósitos de HA visibles con MEB (Torres et al., 2015). La ausencia de estos depósitos en las imágenes de MEB obtenidas en este trabajo posiblemente sean consecuencia del corto tiempo de cultivo. Por último, en este trabajo las MSCs empleadas son todas provenientes de donantes y entre las muestras humanas está descrita una heterogeneidad (D'Ippolito, Schiller, Ricordi, Roos, & Howard, 1999; Huibregtse, Johnstone, Goldberg, & Caplan, 2000) que podría ser responsable de las diferencias existentes entre las MSCs aisladas de una misma localización anatómica frente a la homogeneidad en el comportamiento que presentan las líneas celulares comerciales usadas en estudios anteriores.

En resumen, se considera como válida la hipótesis de partida de esta tesis doctoral (“el potencial osteogénico de las MSCs es una de las características funcionales influenciada por el tejido de origen”) tras los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados en este trabajo, pese a cierta falta de significancia en alguno de ellos. Además, la hipótesis complementaria producida a tenor de los resultados del iTRAQ (“cuanto más cerca estén las MSCs del hueso, mayor será el compromiso con la diferenciación osteogénica”) se ve apoyada por los resultados obtenidos en la tinción de Rojo Alizarina, aunque no se alcanza a confirmar en el ensayo de la actividad ALP. Esta diferencia en los resultados entre los dos ensayos empleados para medir el potencial osteogénico seguramente sea debida a que miden distintos puntos del proceso de diferenciación ya que el Rojo Alizarina confirma la diferenciación al linaje osteoblástico mientras

que la actividad ALP es un indicador del comienzo de diferenciación. Entre los ensayos, existe otra diferencia y es la duración de ambos ensayos (la tinción de Rojo Alizarina se realizó a los 21 días mientras que la actividad ALP se midió a un tiempo máximo de 7 días) como consecuencia del limitado número de biomateriales. Se considera plausible que con un mayor número de biomateriales y aumentando la duración del cultivo celular, mínimo hasta 14 días, los resultados de la actividad ALP confirmarían la tendencia. También se ha evidenciado que las DP-MSCs es el tipo celular que más rápido crece tanto en plástico como en ambas CaPs, siendo la única que ha formado una capa celular completa en los dos biomateriales. Esta cualidad supone una ventaja en términos de regeneración ósea ya que en un menor tiempo las DP-MSCs logran una alta densidad celular que potenciará la diferenciación osteogénica (Kim & Adachi, 2019); además de compensar un número inferior de MSCs aisladas inicialmente respecto a otras fuentes como el tejido adiposo que entre sus ventajas está la obtención de un gran número inicial de MSCs (Baer & Geiger, 2012). Para finalizar, este trabajo ha arrojado luz sobre la manera en que influye el biomaterial en el comportamiento de MSCs procedentes de distintas localizaciones.

Debido a todo lo anterior y a ventajas logísticas que presentan, entre ellas una obtención mínimamente invasiva con afección mínima para el donante, sin riesgos, rápida y con bajos costes económicos, se considera que las DP-MSCs encajarían en el rol de MSCs óptimas para la regeneración ósea, especialmente en un contexto periodontal. Apoyando esta consideración, recientemente se ha iniciado un ensayo clínico de fase 3 en el que se emplean DP-MSCs para la reparación del labio leporino y paladar hendido (Identificador ClinicalTrials.gov: NCT03766217) y se han publicado prometedores resultados del uso de DP-MSCs para la regeneración periodontal (Ferrarotti et al., 2018).

CONCLUSIONES

1. DP-MSCs son, de las tres localizaciones estudiadas, las MSCs con mayor tasa de crecimiento y las que muestran una mayor capacidad de diferenciación osteogénica en las superficies de plástico de cultivo habitual.
2. Los resultados obtenidos corroboran la hipótesis que postula que el compromiso al linaje osteogénico es mayor en las células extraídas de zonas en las que la osteogénesis es más activa.
3. DP-MSCs han sido las únicas MSCs capaces de colonizar interiormente los poros y generar capas celulares completas sobre ambas CaPs (β -TCP e HA), por lo que es el tipo de MSC con mayor capacidad para colonizar los biomateriales estudiados.
4. Se ha mostrado la tendencia de que DP-MSC es el tipo celular que presenta mayor aumento en la actividad ALP al ser combinado con CaPs.
5. DP-MSC parece el tipo celular idóneo para las técnicas de ingeniería de tejidos dentro del contexto de regeneración ósea.

CONCLUSIONS

1. DP-MSCs are, of the three locations studied, the MSCs with the highest proliferation rate and those that show a greater osteogenic potential on the classic plastic culture surface.
2. The obtained results support the hypothesis that the commitment to the osteogenic lineage is greater in cells isolated from areas where the osteogenesis is more active.
3. DP-MSCs have been the only MSCs able to colonize the pores internally and generate complete cell layers on both CaPs (β -TCP e HA), so it is the MSC with the greatest ability to colonize the studied biomaterials.
4. It has been shown the trend that DP-MSC is the cell type that presents greatest increase in ALP activity when combined with CaPs.
5. DP-MSC emerge as the ideal cell type for tissue engineering in the context of bone regeneration.

REFERENCIAS

Referencias de la sección Introducción

- Almalki, S. G., & Agrawal, D. K. (2016). Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*, 92(1–2), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.02.005>
- Alzahrani, M. M., Anam, E., AlQahtani, S. M., Makhdom, A. M., & Hamdy, R. C. (2018). Strategies of enhancing bone regenerate formation in distraction osteogenesis. *Connective Tissue Research*, 59(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/03008207.2017.1288725>
- Aragon, C. E., & Bohay, R. N. (2005). The application of alveolar distraction osteogenesis following nonresorbable hydroxyapatite grafting in the anterior maxilla: A clinical report. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 93(6), 518–521. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2005.04.010>
- Arcos, D., & Vallet-Regí, M. (2013). Bioceramics for drug delivery. *Acta Materialia*, 61(3), 890–911. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2012.10.039>
- Argintar, E., Edwards, S., & Delahay, J. (2011). Bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Injury*, 42(8), 730–734. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.11.016>
- Atiya, H., Frisbie, L., Pressimone, C., & Coffman, L. (2020). Mesenchymal Stem Cells in the Tumor Microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1234, 31–42. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37184-5_3
- Augat, P., & Schorlemmer, S. (2006). The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. *Age and Ageing*, 35 Suppl 2(suppl_2), ii27–ii31. <https://doi.org/10.1093/ageing/afl081>
- Baer, P. C., & Geiger, H. (2012). Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2012/812693>
- Baharvand, H., Ashtiani, S. K., Valojerdi, M. R., Shahverdi, A., Taei, A., & Sabour, D. (2004). Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 72(5), 224–229. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2004.07205005.x>
- Banks, W. J., Epling, G. P., Kainer, R. A., & Davis, R. W. (1968). Antler growth and osteoporosis I. Morphological and morphometric changes in the costal compacta during the antler growth cycle. *The Anatomical Record*, 162(4), 387–397. <https://doi.org/10.1002/ar.1091620401>
- Barzilay, R., Melamed, E., & Offen, D. (2009). Introducing Transcription Factors to Multipotent Mesenchymal Stem Cells: Making Transdifferentiation Possible. *Stem Cells*, 27(10), 2509–2515. <https://doi.org/10.1002/stem.172>
- Begam, H., Nandi, S. K., Kundu, B., & Chanda, A. (2017). Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 856–869. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.074>
- Beier, J. P., Klumpp, D., Rudisile, M., Dersch, R., Wendorff, J. H., Bleiziffer, O., ... Kneser, U. (2009). Collagen matrices from sponge to nano: new perspectives for tissue engineering of skeletal muscle. *BMC Biotechnology*, 9(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-34>
- Bekmurzayeva, A., Duncanson, W. J., Azevedo, H. S., & Kanayeva, D. (2018). Surface

- modification of stainless steel for biomedical applications: Revisiting a century-old material. *Materials Science and Engineering: C*, 93, 1073–1089.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.049>
- Bell, E., Ehrlich, H., Buttle, D., & Nakatsuji, T. (1981). Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*, 211(4486), 1052–1054.
<https://doi.org/10.1126/science.7008197>
- Bernardi, L., Luisi, S. B., Fernandes, R., Dalberto, T. P., Valentim, L., Bogo Chies, J. A., ... Pranke, P. (2011). The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *Journal of Endodontics*, 37(7), 973–979.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.04.010>
- Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*, 2(4), 313–319.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002>
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 26(2), 229–238.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.320>
- Bonewald, L. F., & Johnson, M. L. (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, 42(4), 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.12.224>
- Bongso, A. (2006). Blastocyst Culture for Deriving Human Embryonic Stem Cells. In *Human Embryonic Stem Cell Protocols* (Vol. 331, pp. 13–22). <https://doi.org/10.1385/1-59745-046-4:13>
- Boskey, A. L., & Robey, P. G. (2013). The Composition of Bone. In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* (pp. 49–58).
<https://doi.org/10.1002/9781118453926.ch6>
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature01658>
- Bray, A. F., Cevallos, R. R., Gazarian, K., & Lamas, M. (2014). Human dental pulp stem cells respond to cues from the rat retina and differentiate to express the retinal neuronal marker rhodopsin. *Neuroscience*, 280, 142–155.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.023>
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., ... Scadden, D. T. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960), 841–846. <https://doi.org/10.1038/nature02040>
- Cao, Y., Vacanti, J. P., Paige, K. T., Upton, J., & Vacanti, C. A. (1997). Transplantation of Chondrocytes Utilizing a Polymer-Cell Construct to Produce Tissue-Engineered Cartilage in the Shape of a Human Ear. *Plastic & Reconstructive Surgery*, 100(2), 297–302.
<https://doi.org/10.1097/00006534-199708000-00001>
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5), 641–650.
<https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- Caplan, A. I. (1994). The mesengenic process. *Clinics in Plastic Surgery*, 21(3), 429–435.
 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7924141>
- Carpue, J. (1816). *An Account of two successful Operations for restoring a lost Nose (lost Noses) from the Integuments of the Forehead, in the Cases of two Officers in His Majesty's Army :*

- to which are affixed, *Historical and Physiological Remarks on the Nasal Operation*; in. 376–384.
- Castro-Manrreza, M. E., & Montesinos, J. J. (2015). Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *Journal of Immunology Research*, 2015, 394917. <https://doi.org/10.1155/2015/394917>
- Catagni, M. A., Guerreschi, F., & Lovisetti, L. (2011). Distraction osteogenesis for bone repair in the 21st century: Lessons learned. *Injury*, 42(6), 580–586. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.04.004>
- Chatziravdeli, V., Katsaras, G. N., & Lambrou, G. I. (2019). Gene Expression in Osteoblasts and Osteoclasts Under Microgravity Conditions: A Systematic Review. *Current Genomics*, 20(3), 184–198. <https://doi.org/10.2174/1389202920666190422142053>
- Chen, H., Senda, T., & Kubo, K. (2015). The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Medical Molecular Morphology*, 48(2), 61–68. <https://doi.org/10.1007/s00795-015-0099-y>
- Cheng, L., Ye, F., Yang, R., Lu, X., Shi, Y., Li, L., ... Bu, H. (2010). Osteoinduction of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate bioceramics in mice with a fractured fibula. *Acta Biomaterialia*, 6(4), 1569–1574. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.050>
- Chien, K. R. (2008). Regenerative medicine and human models of human disease. *Nature*, 453(7193), 302–305. <https://doi.org/10.1038/nature07037>
- Choi, E. W., Seo, M. K., Woo, E. Y., Kim, S. H., Park, E. J., & Kim, S. (2018). Exosomes from human adipose-derived stem cells promote proliferation and migration of skin fibroblasts. *Experimental Dermatology*, 27(10), 1170–1172. <https://doi.org/10.1111/exd.13451>
- Choong, P.-F., Mok, P.-L., Cheong, S.-K., Leong, C.-F., & Then, K.-Y. (2007). Generating neuron-like cells from BM-derived mesenchymal stromal cells in vitro. *Cytotherapy*, 9(2), 170–183. <https://doi.org/10.1080/14653240701196829>
- Cionca, N., Hashim, D., & Mombelli, A. (2017). Zirconia dental implants: where are we now, and where are we heading? *Periodontology 2000*, 73(1), 241–258. <https://doi.org/10.1111/prd.12180>
- Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(Supplement 3), S131–S139. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
- Cole, F. J. (1944). Aristotle Generation of Animals. *Nature*, 154(3919), 722–723. <https://doi.org/10.1038/154722a0>
- Condic, M. L. (2014). Totipotency: What It Is and What It Is Not. *Stem Cells and Development*, 23(8), 796–812. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0364>
- Cooke, A. M. (1955). OSTEOPOROSIS. *The Lancet*, 265(6870), 877–882. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(55\)90374-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(55)90374-3)
- Cristaldi, M., Mauceri, R., Tomasello, L., Pizzo, G., Pizzolanti, G., Giordano, C., & Campisi, G. (2018). Dental pulp stem cells for bone tissue engineering: A review of the current literature and a look to the future. *Regenerative Medicine*, 13(2), 207–218. <https://doi.org/10.2217/rme-2017-0112>
- Cunningham, J. J., Ulbright, T. M., Pera, M. F., & Looijenga, L. H. J. (2012). Lessons from human

- teratomas to guide development of safe stem cell therapies. *Nature Biotechnology*, 30(9), 849–857. <https://doi.org/10.1038/nbt.2329>
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 11), 2204–2213. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>
- Daar, A. S. (2013). The Future of Replacement and Restorative Therapies: From Organ Transplantation to Regenerative Medicine. *Transplantation Proceedings*, 45(10), 3450–3452. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.09.011>
- Daar, A. S., & Greenwood, H. L. (2007). A proposed definition of regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(3), 179–184. <https://doi.org/10.1002/term.20>
- Dahabreh, Z., Panteli, M., Pountos, I., Howard, M., Campbell, P., & Giannoudis, P. V. (2014). Ability of bone graft substitutes to support the osteoprogenitor cells: An in-vitro study. *World Journal of Stem Cells*, 6(4), 497–504. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i4.497>
- Dallas, S. L., Prideaux, M., & Bonewald, L. F. (2013). The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocrine Reviews*, 34(5), 658–690. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1026>
- Dameshek, W. (1957). Bone marrow transplantation; a present-day challenge. *Blood*, 12(4), 321–323. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13412760>
- de la Morena, M. T., & Gatti, R. A. (2010). A history of bone marrow transplantation. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 30(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2009.11.005>
- De Miguel, M. P., Fuentes-Julián, S., & Alcaina, Y. (2010). Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Reviews and Reports*, 6(4), 633–649. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9170-1>
- Descamps, M., Boilet, L., Moreau, G., Tricoteaux, A., Lu, J., Leriche, A., ... Cambier, F. (2013). Processing and properties of biphasic calcium phosphates bioceramics obtained by pressureless sintering and hot isostatic pressing. *Journal of the European Ceramic Society*, 33(7), 1263–1270. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2012.12.020>
- Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., & Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Doppler, S. A., Deutsch, M.-A., Lange, R., & Krane, M. (2013). Cardiac regeneration: current therapies-future concepts. *Journal of Thoracic Disease*, 5(5), 683–697. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.71>
- Dudley, H. R., & Spiro, D. (1961). THE FINE STRUCTURE OF BONE CELLS. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 11(3), 627–649. <https://doi.org/10.1083/jcb.11.3.627>
- Ebben, J. D., Zorniak, M., Clark, P. A., & Kuo, J. S. (2011). Introduction to Induced Pluripotent Stem Cells: Advancing the Potential for Personalized Medicine. *World Neurosurgery*,

- 76(3–4), 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2010.12.055>
- Einhorn, T. A. (1998). The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 355S, S7–S21. <https://doi.org/10.1097/00003086-199810001-00003>
- El Deeb, M., Tompach, P. C., Morstad, A. T., & Kwon, P. (1991). Long-term follow-up of the use of nonporous hydroxyapatite for augmentation of the alveolar ridge. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 49(3), 257–261. [https://doi.org/10.1016/0278-2391\(91\)90215-8](https://doi.org/10.1016/0278-2391(91)90215-8)
- Engin, F., Yao, Z., Yang, T., Zhou, G., Bertin, T., Jiang, M. M., ... Lee, B. (2008). Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nature Medicine*, 14(3), 299–305. <https://doi.org/10.1038/nm1712>
- Escacena, N., Quesada-Hernández, E., Capilla-Gonzalez, V., Soria, B., & Hmadcha, A. (2015). Bottlenecks in the Efficient Use of Advanced Therapy Medicinal Products Based on Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells International*, 2015, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/895714>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981a). Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981b). Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Everts, V., Delaissé, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P., & Beertsen, W. (2002). The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(1), 77–90. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.1.77>
- Felician, F. F., Xia, C., Qi, W., & Xu, H. (2018). Collagen from Marine Biological Sources and Medical Applications. *Chemistry & Biodiversity*, 15(5), e1700557. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700557>
- Feng, J. Q., Ward, L. M., Liu, S., Lu, Y., Xie, Y., Yuan, B., ... White, K. E. (2006). Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nature Genetics*, 38(11), 1310–1315. <https://doi.org/10.1038/ng1905>
- Feng, X. (2005). Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts. *Gene*, 350(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.01.014>
- Ferreira, A. da F., & Gomes, D. A. (2018). Stem Cell Extracellular Vesicles in Skin Repair. *Bioengineering*, 6(1), 4. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6010004>
- Finkemeier, C. G. (2002). Bone-grafting and bone-graft substitutes. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 84(3), 454–464. <https://doi.org/10.2106/00004623-200203000-00020>
- Foo, M. E., & Gopinath, S. C. B. (2017). Feasibility of graphene in biomedical applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.122>
- Frank, R. M., Wiedemann, P., Hemmerle, J., & Freymann, M. (1991). Pulp capping with synthetic hydroxyapatite in human premolars. *Journal of Applied Biomaterials*, 2(4), 243–250. <https://doi.org/10.1002/jab.770020405>
- Franz-Odenaal, T. A., Hall, B. K., & Witten, P. E. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association*

- of Anatomists*, 235(1), 176–190. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20603>
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3(4), 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., & Gerasimov, U. V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Proliferation*, 20(3), 263–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1987.tb01309.x>
- Frost, H. (1964). *Dynamics of bone remodeling*.
- Gathier, W., Türktaş, Z., & Duckers, H. J. (2016). Adipose-Derived Stem Cells. In *Stem Cell and Gene Therapy for Cardiovascular Disease* (pp. 119–135). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801888-0.00010-2>
- Giannoudis, P. V., Calori, G. M., Begue, T., & Schmidmaier, G. (2013). Bone regeneration strategies: Current trends but what the future holds? *Injury*, 44, S1–S2. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(13\)70002-0](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(13)70002-0)
- Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100(9), 1249–1260. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09>
- Giordano, A., Galderisi, U., & Marino, I. R. (2007). From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 211(1), 27–35. <https://doi.org/10.1002/jcp.20959>
- Gokhale, J. A., Boskey, A. L., & Robey, P. G. (2001). The Biochemistry of Bone. In *Osteoporosis* (pp. 107–188). <https://doi.org/10.1016/B978-012470862-4/50005-2>
- Goldwyn, R. M. (1968). Johann Friedrich Dieffenbach (1794-1847). *Plastic and Reconstructive Surgery*, 42(1), 19–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4875688>
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Hambiliki, F., Ström, S., Zhang, P., & Stavreus-Evers, A. (2012). Co-localization of NANOG and OCT4 in human pre-implantation embryos and in human embryonic stem cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(10), 1021–1028. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9824-9>
- Hannemann, P. F. W., Mommers, E. H. H., Schots, J. P. M., Brink, P. R. G., & Poeze, M. (2014). The effects of low-intensity pulsed ultrasound and pulsed electromagnetic fields bone growth stimulation in acute fractures: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 134(8), 1093–1106. <https://doi.org/10.1007/s00402-014-2014-8>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 9(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Hayashi, Y., Ohnuma, K., & Furue, M. K. (2019). *Pluripotent Stem Cell Heterogeneity*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11096-3_6
- Heise, U., Osborn, J. F., & Duwe, F. (1990). Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute.

- International Orthopaedics*, 14(3). <https://doi.org/10.1007/BF00178768>
- Henson, F., & Getgood, A. (2011). The use of scaffolds in musculoskeletal tissue engineering. *The Open Orthopaedics Journal*, 5 Suppl 2(1), 261–266. <https://doi.org/10.2174/1874325001105010261>
- Hilton, M. J., Tu, X., Wu, X., Bai, S., Zhao, H., Kobayashi, T., ... Long, F. (2008). Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nature Medicine*, 14(3), 306–314. <https://doi.org/10.1038/nm1716>
- Hipp, J., & Atala, A. (2008). Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews*, 4(1), 3–11. <https://doi.org/10.1007/s12015-008-9010-8>
- Hoffman, A. S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00239-3)
- Hollands, P., Aboyeji, D., & Orcharton, M. (2018). Dental pulp stem cells in regenerative medicine. *British Dental Journal*, 224(9), 747–750. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.348>
- Horch, R. E., Popescu, L. M., & Polykandriotis, E. (2016). History of Regenerative Medicine. In *Regenerative Medicine - from Protocol to Patient* (pp. 1–19). https://doi.org/10.1007/978-3-319-28293-0_1
- Howell, J. C., & Wells, J. M. (2011). Generating intestinal tissue from stem cells: potential for research and therapy. *Regenerative Medicine*, 6(6), 743–755. <https://doi.org/10.2217/rme.11.90>
- Hu, H., Hilton, M. J., Tu, X., Yu, K., Ornitz, D. M., & Long, F. (2005). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development (Cambridge, England)*, 132(1), 49–60. <https://doi.org/10.1242/dev.01564>
- Hu, L., Liu, Y., & Wang, S. (2018). Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. *Oral Diseases*, 24(5), 696–705. <https://doi.org/10.1111/odi.12703>
- Huang, A. H.-C., Chen, Y.-K., Lin, L.-M., Shieh, T.-Y., & Chan, A. W.-S. (2008). Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 37(9), 571–574. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2008.00654.x>
- Hufnagel, D., Li, F., Cosar, E., Krikun, G., & Taylor, H. S. (2015). The Role of Stem Cells in the Etiology and Pathophysiology of Endometriosis. *Seminars in Reproductive Medicine*, 33(5), 333–340. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1564609>
- Ilancheran, S., Moodley, Y., & Manuelpillai, U. (2009). Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta*, 30(1), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.09.009>
- Inoue, M., LeGeros, R. Z., Inoue, M., Tsujigiwa, H., Nagatsuka, H., Yamamoto, T., & Nagai, N. (2004). In vitro response of osteoblast-like and odontoblast-like cells to unsubstituted and substituted apatites. *Journal of Biomedical Materials Research*, 70A(4), 585–593. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30116>
- Itzstein, C., Coxon, F. P., & Rogers, M. J. (2011). The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases. *Small GTPases*, 2(3), 117–130. <https://doi.org/10.4161/sgtp.2.3.16453>
- Jilka, R. L., Noble, B., & Weinstein, R. S. (2013). Osteocyte apoptosis. *Bone*, 54(2), 264–271.

- <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.11.038>
- Kaiser, L. R. (1992). The future of multihospital systems. *Topics in Health Care Financing*, 18(4), 32–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1631884>
- Kamiya, N., Kobayashi, T., Mochida, Y., Yu, P. B., Yamauchi, M., Kronenberg, H. M., & Mishina, Y. (2010). Wnt inhibitors Dkk1 and Sost are downstream targets of BMP signaling through the type IA receptor (BMPRIA) in osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 25(2), 200–210. <https://doi.org/10.1359/jbmr.090806>
- Kawasaki, T. (1991). Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing. *Journal of Chromatography A*, 544, 147–184. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)83984-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)83984-4)
- Kawashima, N. (2012). Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Archives of Oral Biology*, 57(11), 1439–1458. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.08.010>
- Kenkre, J. S., & Bassett, J. H. D. (2018). The bone remodelling cycle. In *Annals of Clinical Biochemistry* (Vol. 55). <https://doi.org/10.1177/0004563218759371>
- Kichenbrand, C., Velot, E., Menu, P., & Moby, V. (2019). Dental Pulp Stem Cell-Derived Conditioned Medium: An Attractive Alternative for Regenerative Therapy. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 25(1), 78–88. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2018.0168>
- Kleinsmith, L. J., & Pierce, G. B. (1964). MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. *Cancer Research*, 24, 1544–1551. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14234000>
- Knyszalska-Karwan, Z., Kaczmarczyk-Stachowska, A., Slosarczyk, A., Stobierska, E., & Paszkiewicz, Z. (1997). Long-term results of hydroxyapatite application in the treatment of periodontal osseous defects. *Frontiers of Medical and Biological Engineering : The International Journal of the Japan Society of Medical Electronics and Biological Engineering*, 8(4), 239–252. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9801880>
- Kobayashi, T., Shingaki, S., Nakajima, T., & Hanada, K. (1993). Chin augmentation with porous hydroxyapatite blocks. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, 3(4), 283–294. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10172030>
- Komori, T. (2018). Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochemistry and Cell Biology*, 149(4), 313–323. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1640-6>
- Kopen, G. C., Prockop, D. J., & Phinney, D. G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), 10711–10716. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10711>
- Körbling, M., & Estrov, Z. (2003). Adult Stem Cells for Tissue Repair — A New Therapeutic Concept? *New England Journal of Medicine*, 349(6), 570–582. <https://doi.org/10.1056/NEJMr022361>
- Koshino, T., Murase, T., Takagi, T., & Saito, T. (2001). New bone formation around porous hydroxyapatite wedge implanted in opening wedge high tibial osteotomy in patients with osteoarthritis. *Biomaterials*, 22(12), 1579–1582. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00318-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00318-5)

- Kratz, G., & Huss, F. (2003). Tissue Engineering — Body Parts from the Petri Dish. *Scandinavian Journal of Surgery*, 92(4), 241–247. <https://doi.org/10.1177/145749690309200402>
- Kucharzewski, M., Rojczyk, E., Wilemska-Kucharzewska, K., Wilk, R., Hudecki, J., & Los, M. J. (2019). Novel trends in application of stem cells in skin wound healing. *European Journal of Pharmacology*, 843, 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.12.012>
- Kuci, S., Kuci, Z., Latifi-Pupovci, H., Niethammer, D., Handgretinger, R., Schumm, M., ... Klingebiel, T. (2009). Adult Stem Cells as an Alternative Source of Multipotential (Pluripotent) Cells in Regenerative Medicine. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 4(2), 107–117. <https://doi.org/10.2174/157488809788167427>
- Langer, R., & Vacanti, J. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Law, S., & Chaudhuri, S. (2013). Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges. *American Journal of Stem Cells*, 2(1), 22–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671814>
- Legeros, R. Z., & Legeros, J. P. (2008). Hydroxyapatite. In *Bioceramics and their Clinical Applications* (pp. 367–394). <https://doi.org/10.1533/9781845694227.2.367>
- Leong, W. K., Henshall, T. L., Arthur, A., Kremer, K. L., Lewis, M. D., Helps, S. C., ... Koblar, S. A. (2012). Human Adult Dental Pulp Stem Cells Enhance Poststroke Functional Recovery Through Non-Neural Replacement Mechanisms. *STEM CELLS Translational Medicine*, 1(3), 177–187. <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0039>
- Li, C., Wu, X., Tong, J., Yang, X., Zhao, J., Zheng, Q., ... Ma, Z. (2015). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy*, 6, 55. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0066-5>
- Liu, F., Malaval, L., & Aubin, J. E. (1997). The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity. *Experimental Cell Research*, 232(1), 97–105. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3501>
- Lombardi, F., Palumbo, P., Augello, F. R., Cifone, M. G., Cinque, B., & Giuliani, M. (2019). Secretome of Adipose Tissue-Derived Stem Cells (ASCs) as a Novel Trend in Chronic Non-Healing Wounds: An Overview of Experimental In Vitro and In Vivo Studies and Methodological Variables. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3721. <https://doi.org/10.3390/ijms20153721>
- Lough, J., Barron, M., Brogley, M., Sugi, Y., Bolender, D. L., & Zhu, X. (1996). Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precordial embryonic mesoderm. *Developmental Biology*, 178(1), 198–202. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0211>
- Lysaght, M. J., & Crager, J. (2009). Origins. *Tissue Engineering. Part A*, 15(7), 1449–1450. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0412>
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 21(2), 115–137. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0395>
- Marone, M., De Ritis, D., Bonanno, G., Mozzetti, S., Rutella, S., Scambia, G., & Pierelli, L. (2002). Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation. *Leukemia & Lymphoma*, 43(3), 493–501. <https://doi.org/10.1080/10428190290011967>

- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- Martínez-Morales, P. L., Revilla, A., Ocaña, I., González, C., Sainz, P., McGuire, D., & Liste, I. (2013). Progress in Stem Cell Therapy for Major Human Neurological Disorders. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(5), 685–699. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9443-6>
- Mashinchian, O., Pisconti, A., Le Moal, E., & Bentzinger, C. F. (2018). *The Muscle Stem Cell Niche in Health and Disease*. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.08.003>
- Matic, I., Matthews, B. G., Wang, X., Dymont, N. A., Worthley, D. L., Rowe, D. W., ... Kalajzic, I. (2016). Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 34(12), 2930–2942. <https://doi.org/10.1002/stem.2474>
- Matthews, L. G. (1968). SS. Cosmas and Damian— Patron Saints of Medicine and Pharmacy Their Cult in England. *Medical History*, 12(3), 281–288. <https://doi.org/10.1017/S0025727300013338>
- Mazini, L., Rochette, L., Admou, B., Amal, S., & Malka, G. (2020). Hopes and limits of adipose-derived stem cells (ADSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041306>
- McIntosh, K. R. (2011). *Evaluation of Cellular and Humoral Immune Responses to Allogeneic Adipose-Derived Stem/Stromal Cells*. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-960-4_11
- McKeen, L. W. (2019). Introduction to Plastics and Polymers. In *The Effect of UV Light and Weather on Plastics and Elastomers* (pp. 1–20). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816457-0.00001-0>
- Medellin-Castillo, N. A., Leyva-Ramos, R., Ocampo-Perez, R., Garcia de la Cruz, R. F., Aragon-Piña, A., Martinez-Rosales, J. M., ... Fuentes-Rubio, L. (2007). Adsorption of Fluoride from Water Solution on Bone Char. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46(26), 9205–9212. <https://doi.org/10.1021/ie070023n>
- Miller, S. C., de Saint-Georges, L., Bowman, B. M., & Jee, W. S. (1989). Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microscopy*, 3(3), 953–960; discussion 960-1. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2694361>
- Moester, M. J. C., Papapoulos, S. E., Löwik, C. W. G. M., & van Bezooijen, R. L. (2010). Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcified Tissue International*, 87(2), 99–107. <https://doi.org/10.1007/s00223-010-9372-1>
- Moffatt, S. L., Cartwright, V. A., & Stumpf, T. H. (2005). Centennial review of corneal transplantation. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 33(6), 642–657. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2005.01134.x>
- Murshed, M., Harmey, D., Millán, J. L., McKee, M. D., & Karsenty, G. (2005). Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes & Development*, 19(9), 1093–1104. <https://doi.org/10.1101/gad.1276205>
- Nakagawa, N., Saegusa, Y., Abe, S., Miura, Y., & Yoshiya, S. (2006). THE EFFECTIVENESS OF RA WRIST FUSION USING BETA-TCP WITHOUT AUTOGENOUS ILIAC BONE GRAFTING: A REPORT OF FOUR CASES. *Hand Surgery*, 11(01n02), 71–75. <https://doi.org/10.1142/S0218810406003139>

- Nakamura, S., Yamada, Y., Katagiri, W., Sugito, T., Ito, K., & Ueda, M. (2009). Stem Cell Proliferation Pathways Comparison between Human Exfoliated Deciduous Teeth and Dental Pulp Stem Cells by Gene Expression Profile from Promising Dental Pulp. *Journal of Endodontics*, 35(11), 1536–1542. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.07.024>
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (2002). The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell*, 108(1), 17–29. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00622-5)
- Narayanan, A., Srinaath, N., Rohini, M., & Selvamurugan, N. (2019). Regulation of Runx2 by MicroRNAs in osteoblast differentiation. *Life Sciences*, 232, 116676. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116676>
- Natu, S. S., Ali, I., Alam, S., Giri, K. Y., Agarwal, A., & Kulkarni, V. A. (2014). The biology of distraction osteogenesis for correction of mandibular and craniomaxillofacial defects: A review. *Dental Research Journal*, 11(1), 16–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24688555>
- Nauth, A., Ristevski, B., Li, R., & Schemitsch, E. H. (2011). Growth factors and bone regeneration: How much bone can we expect? *Injury*, 42(6), 574–579. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.034>
- Negishi-Koga, T., & Takayanagi, H. (2012). Bone cell communication factors and Semaphorins. *BoneKEy Reports*, 1, 183. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2012.183>
- Neumann, P. E., & Gest, T. R. (2019). How many bones? Every bone in my body. *Clinical Anatomy*, (June), 1–5. <https://doi.org/10.1002/ca.23425>
- Ng, A. J., Mutsaers, A. J., Baker, E. K., & Walkley, C. R. (2012). Genetically engineered mouse models and human osteosarcoma. *Clinical Sarcoma Research*, 2(1), 19. <https://doi.org/10.1186/2045-3329-2-19>
- Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V, ... Firsov, A. A. (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5696), 666–669. <https://doi.org/10.1126/science.1102896>
- Ogose, A., Hotta, T., Kawashima, H., Kondo, N., Gu, W., Kamura, T., & Endo, N. (2005). Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. *Journal of Biomedical Materials Research*, 72B(1), 94–101. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30136>
- Orimo, H. (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku Zasshi*, 77(1), 4–12. <https://doi.org/10.1272/jnms.77.4>
- Panteli, M., Pountos, I., Jones, E., & Giannoudis, P. V. (2015). Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(4), 685–713. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12532>
- Paré, A., Bossard, A., Laure, B., Weiss, P., Gauthier, O., & Corre, P. (2019). Reconstruction of segmental mandibular defects: Current procedures and perspectives. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, 4(6), 587–596. <https://doi.org/10.1002/lio2.325>
- Parkinson, I. H., & Fazzalari, N. L. (2013). Characterisation of Trabecular Bone Structure. In M. J. Silva (Ed.), *Skeletal Aging and Osteoporosis* (pp. 31–51). https://doi.org/10.1007/8415_2011_113

- Passier, R. (2003). Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovascular Research*, 58(2), 324–335. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00770-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00770-8)
- Peltola, M. J., Aitasalo, K. M. J., Suonpää, J. T. K., Yli-Urpo, A., & Laippala, P. J. (2001). In vivo model for frontal sinus and calvarial bone defect obliteration with bioactive glass S53P4 and hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research*, 58(3), 261–269. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(2001\)58:3<261::AID-JBM1015>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-4636(2001)58:3<261::AID-JBM1015>3.0.CO;2-7)
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Porter, J. R., Ruckh, T. T., & Popat, K. C. (2009). Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology Progress*, 25(6), NA-NA. <https://doi.org/10.1002/btpr.246>
- Potdar, P. D., & Jethmalani, Y. D. (2015). Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, 7(5), 839–851. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i5.839>
- Pountos, I., Georgouli, T., Kontakis, G., & Giannoudis, P. V. (2010). Efficacy of minimally invasive techniques for enhancement of fracture healing: evidence today. *International Orthopaedics*, 34(1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/s00264-009-0892-0>
- Pountos, I., & Giannoudis, P. V. (2016). Is there a role of coral bone substitutes in bone repair? *Injury*, 47(12), 2606–2613. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2016.10.025>
- Pountos, I., Panteli, M., Panagiotopoulos, E., Jones, E., & Giannoudis, P. V. (2014). Can we enhance fracture vascularity: What is the evidence? *Injury*, 45, S49–S57. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2014.04.009>
- Puissant, B., Barreau, C., Bourin, P., Clavel, C., Corre, J., Bousquet, C., ... Blancher, A. (2005). Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology*, 129(1), 118–129. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x>
- Quarles, L. D. (2012). Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: implications in chronic kidney disease. *Experimental Cell Research*, 318(9), 1040–1048. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.027>
- Racz, G. Z., Kadar, K., Foldes, A., Kallo, K., Perczel-Kovach, K., Keremi, B., ... Varga, G. (2014). Immunomodulatory and potential therapeutic role of mesenchymal stem cells in periodontitis. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 65(3), 327–339. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24930504>
- Raggi, C., & Berardi, A. C. (2012). Mesenchymal stem cells, aging and regenerative medicine. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 2(3), 239–242. <https://doi.org/23738303>
- Ratajczak, M. Z., Jadczyk, T., Pędziwiatr, D., & Wojakowski, W. (2014). New advances in stem cell research: Practical implications for regenerative medicine. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 124(7–8), 417–426. <https://doi.org/10.20452/pamw.2355>
- Ratajczak, M., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Poniewierska, A., Suszynska, M., & Ratajczak, J. (2012). Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Advances in Medical Sciences*, 57(1), 1–17. <https://doi.org/10.2478/v10039-012-0020-z>

- Redondo, L. M., García Cantera, J. M., Hernández, A. V., & Puerta, C. V. (1995). Effect of particulate porous hydroxyapatite on osteoinduction of demineralized bone autografts in experimental reconstruction of the rat mandible. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 24(6), 445–448. [https://doi.org/10.1016/S0901-5027\(05\)80475-8](https://doi.org/10.1016/S0901-5027(05)80475-8)
- Ren, G., Chen, X., Dong, F., Li, W., Ren, X., Zhang, Y., & Shi, Y. (2012). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells and Translational Medicine: Emerging Issues. *STEM CELLS Translational Medicine*, 1(1), 51–58. <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0019>
- Ren, H., Sang, Y., Zhang, F., Liu, Z., Qi, N., & Chen, Y. (2016). Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord, Dental Pulp, and Menstrual Blood as Sources for Cell Therapy. *Stem Cells International*, 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/3516574>
- Ren, S., Chen, J., Duscher, D., Liu, Y., Guo, G., Kang, Y., ... Chen, Z. (2019). Microvesicles from human adipose stem cells promote wound healing by optimizing cellular functions via AKT and ERK signaling pathways. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1152-x>
- Rey, C., Combes, C., Drouet, C., & Somrani, S. (2008). Tricalcium phosphate-based ceramics. In *Bioceramics and their Clinical Applications* (pp. 326–366). <https://doi.org/10.1533/9781845694227.2.326>
- Ribatti, D. (2018). An historical note on the cell theory. *Experimental Cell Research*, 364(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.01.038>
- Robling, A. G., & Bonewald, L. F. (2020). The Osteocyte: New Insights. *Annual Review of Physiology*, 82(1), 485–506. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034332>
- Rodda, S. J., & McMahon, A. P. (2006). Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development (Cambridge, England)*, 133(16), 3231–3244. <https://doi.org/10.1242/dev.02480>
- Rokaya, D., Srimaneepong, V., Sapkota, J., Qin, J., Siraleartmukul, K., & Siriwoongrunson, V. (2018). Polymeric materials and films in dentistry: An overview. *Journal of Advanced Research*, 14, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.001>
- Ross, F. P. (2013). Osteoclast Biology and Bone Resorption. In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* (pp. 25–33). <https://doi.org/10.1002/9781118453926.ch3>
- Rossant, J. (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 19(6), 477–482. <https://doi.org/10.1634/stemcells.19-6-477>
- Salgado, A. J., Oliveira, J. M., Martins, A., Teixeira, F. G., Silva, N. A., Neves, N. M., ... Reis, R. L. (2013). *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410499-0.00001-0>
- Salibian, A. A., Widgerow, A. D., Abrouk, M., & Evans, G. R. (2013). Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications. *Archives of Plastic Surgery*, 40(6), 666–675. <https://doi.org/10.5999/aps.2013.40.6.666>
- Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., ... Niitsu, Y. (2005). Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 106(2), 756–763. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0572>

- Scadden, D. T. (2014). Nice Neighborhood: Emerging Concepts of the Stem Cell Niche. *Cell*, 157(1), 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.013>
- Schaffler, M. B., Cheung, W.-Y., Majeska, R., & Kennedy, O. (2014). Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcified Tissue International*, 94(1), 5–24. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9790-y>
- Schofer, M. D., Block, J. E., Aigner, J., & Schmelz, A. (2010). Improved healing response in delayed unions of the tibia with low-intensity pulsed ultrasound: results of a randomized sham-controlled trial. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 11(1), 229. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-229>
- Silver, I. A., Murrills, R. J., & Etherington, D. J. (1988). Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Experimental Cell Research*, 175(2), 266–276. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90191-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90191-7)
- St John, T. A., Vaccaro, A. R., Sah, A. P., Schaefer, M., Berta, S. C., Albert, T., & Hilibrand, A. (2003). Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting. *American Journal of Orthopedics (Belle Mead, N.J.)*, 32(1), 18–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12580346>
- Stout, S. D., Brunsden, B. S., Hildebolt, C. F., Commean, P. K., Smith, K. E., & Tappen, N. C. (1999). Computer-Assisted 3D Reconstruction of Serial Sections of Cortical Bone to Determine the 3D Structure of Osteons. *Calcified Tissue International*, 65(4), 280–284. <https://doi.org/10.1007/s002239900699>
- Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O., & Michalek, J. (2012). Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells and Development*, 21(14), 2724–2752. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0722>
- Suman, S., Domingues, A., Ratajczak, J., & Ratajczak, M. Z. (2019). *Potential Clinical Applications of Stem Cells in Regenerative Medicine*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31206-0_1
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takito, J., Inoue, S., & Nakamura, M. (2018). The Sealing Zone in Osteoclasts: A Self-Organized Structure on the Bone. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19040984>
- Tamaki, Y., Nakahara, T., Ishikawa, H., & Sato, S. (2013). In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology*. <https://doi.org/10.1007/s10266-012-0075-0>
- Tanaka, Y., & Yamashita, K. (2008). Fabrication processes for bioceramics. In *Bioceramics and their Clinical Applications* (pp. 28–52). <https://doi.org/10.1533/9781845694227.1.28>
- Teitelbaum, S. L., & Ross, F. P. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Reviews. Genetics*, 4(8), 638–649. <https://doi.org/10.1038/nrg1122>

- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Tibbetts, M. D., Samuel, M. A., Chang, T. S., & Ho, A. C. (2012). Stem cell therapy for retinal disease. *Current Opinion in Ophthalmology*, 23(3), 226–234. <https://doi.org/10.1097/ICU.0b013e328352407d>
- Trzaska, K. A., Kuzhikandathil, E. V., & Rameshwar, P. (2007). Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(11), 2797–2808. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0212>
- Udagawa, N., Takahashi, N., Yasuda, H., Mizuno, A., Itoh, K., Ueno, Y., ... Suda, T. (2000). Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, 141(9), 3478–3484. <https://doi.org/10.1210/endo.141.9.7634>
- Väänänen, H. K., & Laitala-Leinonen, T. (2008). Osteoclast lineage and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.037>
- Vacanti, C. (2006). The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 1(3), 569–576. <https://doi.org/10.2755/jcmm010.003.20>
- Vacanti, J. P., Morse, M. A., Saltzman, W. M., Domb, A. J., Perez-Atayde, A., & Langer, R. (1988). Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *Journal of Pediatric Surgery*, 23(1), 3–9. [https://doi.org/10.1016/S0022-3468\(88\)80529-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3468(88)80529-3)
- Veiga, A., Aran, B., Raya, A., Messinis, I., & Mahmood, T. (2020). EBCOG position statement: ethics of stem cell research. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, (2019), 2019–2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.01.017>
- Venken, K. J. T., & Bellen, H. J. (2005). Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics*, 6(3), 167–178. <https://doi.org/10.1038/nrg1553>
- Vimalraj, S., Arumugam, B., Miranda, P. J., & Selvamurugan, N. (2015). Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.008>
- Wagoner Johnson, A. J., & Herschler, B. A. (2011). A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomaterialia*, 7(1), 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.012>
- Wang, J. S., Shum-Tim, D., Galipeau, J., Chedrawy, E., Eliopoulos, N., & Chiu, R. C. (2000). Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 120(5), 999–1005. <https://doi.org/10.1067/mtc.2000.110250>
- Wang, P., Zhao, L., Chen, W., Liu, X., Weir, M., & Xu, H. (2014). Stem Cells and Calcium Phosphate Cement Scaffolds for Bone Regeneration. *Journal of Dental Research*, 93(7), 618–625. <https://doi.org/10.1177/0022034514534689>
- Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S., & Ivanova, N. (2012). Distinct Lineage Specification Roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 10(4), 440–454. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.016>
- Weaver, C. V., & Garry, D. J. (2008). Regenerative biology: a historical perspective and modern

- applications. *Regenerative Medicine*, 3(1), 63–82.
<https://doi.org/10.2217/17460751.3.1.63>
- Williams, D. F. (2009). On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 30(30), 5897–5909.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027>
- Wilmot, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810–813.
<https://doi.org/10.1038/385810a0>
- Witkowski, J. A. (1979). Alexis Carrel and the mysticism of tissue culture. *Medical History*, 23(3), 279–296. <https://doi.org/10.1017/S0025727300051760>
- Wohlrab, F., & Hensch, U. (1988). [The life and work of Carl Weigert (1845-1904) in Leipzig 1878-1885]. *Zentralblatt Fur Allgemeine Pathologie u. Pathologische Anatomie*, 134(8), 743–751. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3068935>
- Xia, L., Lin, K., Jiang, X., Fang, B., Xu, Y., Liu, J., ... Zhang, Z. (2014). Effect of nano-structured bioceramic surface on osteogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.028>
- Yamamoto, T. (2004). Bioceramics. In *Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics* (pp. 22–33). https://doi.org/10.1007/978-1-4471-3774-0_3
- Yan, H., Shi, Y. B., & Huang, J. (2017). iPSCs are safe! *Cell and Bioscience*, 7(1), 1–2.
<https://doi.org/10.1186/s13578-017-0157-3>
- Yang, G., Zhu, L., Hou, N., Lan, Y., Wu, X.-M., Zhou, B., ... Yang, X. (2014). Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell Research*, 24(10), 1266–1269.
<https://doi.org/10.1038/cr.2014.111>
- Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A., & Ding, S. (2006). Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(18), 6907–6912. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602280103>
- Yeo, R. W. Y., Lai, R. C., Zhang, B., Tan, S. S., Yin, Y., Teh, B. J., & Lim, S. K. (2013). Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(3), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.001>
- Yeung, T. M., Chia, L. A., Kosinski, C. M., & Kuo, C. J. (2011). Regulation of self-renewal and differentiation by the intestinal stem cell niche. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(15), 2513–2523. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0687-5>
- Yoon, J., Shim, W. J., Ro, Y. M., & Lim, D.-S. (2005). Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. *Annals of Hematology*, 84(11), 715–721.
<https://doi.org/10.1007/s00277-005-1068-7>
- Young, H. E., & Black, A. C. (2004). Adult stem cells. *The Anatomical Record*, 276A(1), 75–102.
<https://doi.org/10.1002/ar.a.10134>
- Young, H. E., Duplaa, C., Romero-Ramos, M., Chesselet, M.-F., Vourc'h, P., Yost, M. J., ... Black, A. C. (2004). Adult Reserve Stem Cells and Their Potential for Tissue Engineering. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 40(1), 1–80. <https://doi.org/10.1385/CBB:40:1:1>
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic

- cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Zhu, L., Tang, Y., Li, X.-Y., Keller, E. T., Yang, J., Cho, J.-S., ... Weiss, S. J. (2020). Osteoclast-mediated bone resorption is controlled by a compensatory network of secreted and membrane-tethered metalloproteinases. *Science Translational Medicine*, 12(529), eaaw6143. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw6143>

Referencias de la sección Material y Métodos

- Anderson, H. C. (1995). Molecular biology of matrix vesicles. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (314), 266–280. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7634645>
- Aydin, S., & Şahin, F. (2019). Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1144, 123–132. https://doi.org/10.1007/5584_2018_333
- De Fries, R., & Mitsuhashi, M. (1995). Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: Comparison of alamarbluetm assay to 3h-thymidine incorporation assay. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 9(2), 89–95. <https://doi.org/10.1002/jcla.1860090203>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Golub, E. E., & Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, 18(5), 444–448. <https://doi.org/10.1097/BCO.0b013e3282630851>
- Gronthos, S., Zannettino, A. C. W., Graves, S. E., Ohta, S., Hay, S. J., & Simmons, P. J. (1999). Differential Cell Surface Expression of the STRO-1 and Alkaline Phosphatase Antigens on Discrete Developmental Stages in Primary Cultures of Human Bone Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(1), 47–56. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.1.47>
- Gudleviciene, Z., Kundrotas, G., Liudkeviciene, R., Rascon, J., & Jurga, M. (2015). Quick and effective method of bone marrow mesenchymal stem cell extraction. *Open Medicine (Poland)*, 10(1), 44–49. <https://doi.org/10.1515/med-2015-0008>
- Huang, G. T. J., Sonoyama, W., Chen, J., & Park, S. H. (2006). In vitro characterization of human dental pulp cells: Various isolation methods and culturing environments. *Cell and Tissue Research*, 324(2), 225–236. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0117-9>
- Moss, D. W. (1992). Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clinical Chemistry*, 38(12), 2486–2492. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1458591>
- Nakayama, G. R., Caton, M. C., Nova, M. P., & Parandoosh, Z. (1997). Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods*, 204(2), 205–208. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00043-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00043-4)
- Page, B., Page, M., & Noel, C. (1993). A NEW FLUOROMETRIC ASSAY FOR CYTOTOXICITY MEASUREMENTS IN-VITRO. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.3.3.473>
- Pesch, K. L., & Simmert, U. (1929). Combined assays for lactose and galactose by enzymatic reactions. *Milchw. Forsch*, 8, 551.
- Prins, H. J., Braat, A. K., Gawlitta, D., Dhert, W. J. A., Egan, D. A., Tijssen-Slump, E., ... Martens, A. C. (2014). In vitro induction of alkaline phosphatase levels predicts in vivo bone forming capacity of human bone marrow stromal cells. *Stem Cell Research*, 12(2), 428–440. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.12.001>
- Qi, H., Aguiar, D. J., Williams, S. M., La Pean, A., Pan, W., & Verfaillie, C. M. (2003). Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human

- mesodermal progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3305–3310. <https://doi.org/10.1073/pnas.0532693100>
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*, 12(9), 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- Shui, C., Spelsberg, T. C., Riggs, B. L., & Khosla, S. (2003). Changes in Runx2/Cbfa1 Expression and Activity During Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(2), 213–221. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.2.213>
- Voytik-Harbin, S. L., Brightman, A. O., Waisner, B., Lamar, C. H., & Badylak, S. F. (1998). Application and evaluation of the alamarblue assay for cell growth and survival of fibroblasts. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 34(3), 239–246. <https://doi.org/10.1007/s11626-998-0130-x>
- Weselsky, P. (1871). Ueber die Azoverbindungen des Resorcins. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 4(2), 613–619.
- White, M. J., DiCaprio, M. J., & Greenberg, D. A. (1996). Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 70(2), 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)00118-5)
- Whyte, M. P. (1994). Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocrine Reviews*, 15(4), 439–461. <https://doi.org/10.1210/edrv-15-4-439>
- Whyte, M. P., Landt, M., Ryan, L. M., Mulivor, R. A., Henthorn, P. S., Fedde, K. N., ... Coburn, S. P. (1995). Alkaline phosphatase: placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. Substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy. *Journal of Clinical Investigation*, 95(4), 1440–1445. <https://doi.org/10.1172/JCI117814>
- Yang, X. F., He, X., He, J., Zhang, L. H., Su, X. J., Dong, Z. Y., ... Li, Y. L. (2011). High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Science*, 18(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-59>
- Zhang, J., Lu, X., Lei, Y., Hou, X., & Wu, P. (2017). Exploring the tunable excitation of QDs to maximize the overlap with the absorber for inner filter effect-based phosphorescence sensing of alkaline phosphatase. *Nanoscale*, 9(40), 15606–15611. <https://doi.org/10.1039/c7nr03673f>

Referencias de la sección Discusión

- Artelt, N., Ludwig, T. A., Rogge, H., Kavvadas, P., Siegerist, F., Blumenthal, A., ... Endlich, N. (2018). The Role of Palladin in Podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(6), 1662–1678. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017091039>
- Baer, P. C., & Geiger, H. (2012). Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2012/812693>
- Björklund, M. (2019). Cell size homeostasis: Metabolic control of growth and cell division. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(3), 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.002>
- Chen, L., Shi, K., Frary, C. E., Ditzel, N., Hu, H., Qiu, W., & Kassem, M. (2015). Inhibiting actin depolymerization enhances osteoblast differentiation and bone formation in human stromal stem cells. *Stem Cell Research*, 15(2), 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.06.009>
- D'Alimonte, I., Mastrangelo, F., Giuliani, P., Pierdomenico, L., Marchisio, M., Zuccarini, M., ... Ciccarelli, R. (2017). Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells: A Comparative Analysis Between Human Subcutaneous Adipose Tissue and Dental Pulp. *Stem Cells and Development*, 26(11), 843–855. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0190>
- D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A., & Howard, G. A. (1999). Age-Related Osteogenic Potential of Mesenchymal Stromal Stem Cells from Human Vertebral Bone Marrow. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(7), 1115–1122. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.7.1115>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Eguchi, K., Akiba, Y., Akiba, N., Nagasawa, M., Cooper, L. F., & Uoshima, K. (2018). Insulin-like growth factor binding Protein-3 suppresses osteoblast differentiation via bone morphogenetic protein-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 507(1–4), 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.065>
- Eguchi, T., Watanabe, K., Hara, E. S., Ono, M., Kuboki, T., & Calderwood, S. K. (2013). OsteoMiR: A Novel Panel of MicroRNA Biomarkers in Osteoblastic and Osteocytic Differentiation from Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, 8(3), e58796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058796>
- Ferrarotti, F., Romano, F., Gamba, M. N., Quirico, A., Giraudi, M., Audagna, M., & Aimetti, M. (2018). Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(7), 841–850. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12931>
- Ghosh, M. (2004). Cofilin Promotes Actin Polymerization and Defines the Direction of Cell Motility. *Science*, 304(5671), 743–746. <https://doi.org/10.1126/science.1094561>
- Golub, E. E., & Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, 18(5), 444–448. <https://doi.org/10.1097/BCO.0b013e3282630851>

- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Gronthos, Stan, Zannettino, A. C. W., Graves, S. E., Ohta, S., Hay, S. J., & Simmons, P. J. (1999). Differential Cell Surface Expression of the STRO-1 and Alkaline Phosphatase Antigens on Discrete Developmental Stages in Primary Cultures of Human Bone Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(1), 47–56. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.1.47>
- Huang, G. T.-J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792–806. <https://doi.org/10.1177/0022034509340867>
- Huibregtse, B. A., Johnstone, B., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. (2000). Effect of age and sampling site on the chondro-osteogenic potential of rabbit marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 18(1), 18–24. <https://doi.org/10.1002/jor.1100180104>
- Jogie-Brahimi, S., Feldman, D., & Oh, Y. (2009). Unraveling Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Actions in Human Disease. *Endocrine Reviews*, 30(5), 417–437. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0028>
- Kim, J., & Adachi, T. (2019). Cell Condensation Triggers the Differentiation of Osteoblast Precursor Cells to Osteocyte-Like Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00288>
- Li, L.-F., Wen, Y., Jiang, L., & Zhu, Y.-Q. (2017). [Study of endoplasmic reticulum stress response in osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue = Shanghai Journal of Stomatology*, 26(6), 577–581. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29691548>
- Lloyd, A. C. (2013). The Regulation of Cell Size. *Cell*, 154(6), 1194–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.053>
- Lobo, S. E., Glickman, R., da Silva, W. N., Arinzeh, T. L., & Kerkis, I. (2015). Response of stem cells from different origins to biphasic calcium phosphate bioceramics. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2116-9>
- Meyers, V. E., Zayzafoon, M., Douglas, J. T., & McDonald, J. M. (2005). RhoA and Cytoskeletal Disruption Mediate Reduced Osteoblastogenesis and Enhanced Adipogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in Modeled Microgravity. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(10), 1858–1866. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050611>
- Nakashima, M., Nagasawa, H., Yamada, Y., & Reddi, A. H. (1994). Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Developmental Biology*, 162(1), 18–28. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1063>
- Prins, H. J., Braat, A. K., Gawlitta, D., Dhert, W. J. A., Egan, D. A., Tjissen-Slump, E., ... Martens, A. C. (2014). In vitro induction of alkaline phosphatase levels predicts in vivo bone forming capacity of human bone marrow stromal cells. *Stem Cell Research*, 12(2), 428–440. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.12.001>
- Puchtler, H., Meloy, S. N., & Terry, M. S. (1969). On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 17(2), 110–124. <https://doi.org/10.1177/17.2.110>

- Ravindran, S., Narayanan, K., Eapen, A. S., Hao, J., Ramachandran, A., Blond, S., & George, A. (2008). Endoplasmic Reticulum Chaperone Protein GRP-78 Mediates Endocytosis of Dentin Matrix Protein 1. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 29658–29670. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800786200>
- Ren, H., Sang, Y., Zhang, F., Liu, Z., Qi, N., & Chen, Y. (2016). Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord, Dental Pulp, and Menstrual Blood as Sources for Cell Therapy. *Stem Cells International*, 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/3516574>
- Tamaki, Y., Nakahara, T., Ishikawa, H., & Sato, S. (2013). In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology*. <https://doi.org/10.1007/s10266-012-0075-0>
- Thorpe, A. A., Creasey, S., Sammon, C., & Le Maitre, C. L. (2016). Hydroxyapatite nanoparticle injectable hydrogel scaffold to support osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *European Cells & Materials*, 32, 1–23. <https://doi.org/10.22203/eCM.v032a01>
- Torres, J., Lopes, A., Lopes, M. A., Gutierrez, M., Cabral, A. T., Fernandes, M. H., ... Santos, J. D. (2015). The Benefit of a Human Bone Marrow Stem Cells Concentrate in addition to an Inorganic Scaffold for Bone Regeneration: An In Vitro Study. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/240698>
- Tsukanaka, M., Fujibayashi, S., Otsuki, B., Takemoto, M., & Matsuda, S. (2015). Osteoinductive potential of highly purified porous β -TCP in mice. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 26(3), 132. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5469-4>
- Vartiainen, M. K., Mustonen, T., Mattila, P. K., Ojala, P. J., Thesleff, I., Partanen, J., & Lappalainen, P. (2002). The Three Mouse Actin-depolymerizing Factor/Cofilins Evolved to Fulfill Cell-Type-specific Requirements for Actin Dynamics. *Molecular Biology of the Cell*, 13(1), 183–194. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-07-0331>
- Wall, M. E., Rachlin, A., Otey, C. A., & Lobo, E. G. (2007). Human adipose-derived adult stem cells upregulate palladin during osteogenesis and in response to cyclic tensile strain. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 293(5), C1532-8. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00065.2007>
- Wang, Y.-H., Liu, Y., Maye, P., & Rowe, D. W. (2006). Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes. *Biotechnology Progress*, 22(6), 1697–1701. <https://doi.org/10.1021/bp060274b>
- Yu, H., Tay, C. Y., Leong, W. S., Tan, S. C. W., Liao, K., & Tan, L. P. (2010). Mechanical behavior of human mesenchymal stem cells during adipogenic and osteogenic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(1), 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.107>
- Yu, J., He, H., Tang, C., Zhang, G., Li, Y., Wang, R., ... Jin, Y. (2010). Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biology*, 11, 32. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-32>
- Zhang, Y., Xing, Y., Jia, L., Ji, Y., Zhao, B., Wen, Y., & Xu, X. (2018). An In Vitro Comparative Study of Multisource Derived Human Mesenchymal Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Stem Cells and Development*, 27(23), 1634–1645. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0119>
- Zhong, Y., Lu, L., Zhou, J., Li, Y., Liu, Y., Clemmons, D. R., & Duan, C. (2011). IGF binding protein

3 exerts its ligand-independent action by antagonizing BMP in zebrafish embryos. *Journal of Cell Science*, 124(11), 1925–1935. <https://doi.org/10.1242/jcs.082644>

ANEXO I:

Resultados

Tabla Anexo 1

Resultados del test AlamarBlue para ASCs en β -TCP de distintas porosidades

Número células	Tiempo	Porógeno	Absorbancia	Media $\pm$ SD
8000	24 horas	P0	0,0012	0,0016 $\pm$ 0,0005
8000	24 horas	P1	0,0015	
8000	24 horas	P5	0,0023	
8000	24 horas	P10	0,0012	
8000	4 días	P0	0,0025	0,0062 $\pm$ 0,0050
8000	4 días	P1	0,0078	
8000	4 días	P5	0,0125	
8000	4 días	P10	0,0019	
8000	6 días	P0	0,0289	0,0245 $\pm$ 0,0046
8000	6 días	P1	0,0290	
8000	6 días	P5	0,0201	
8000	6 días	P10	0,0219	
8000	14 días	P0	0,0123	0,0167 $\pm$ 0,0034
8000	14 días	P1	0,0189	
8000	14 días	P5	0,0158	
8000	14 días	P10	0,0197	
16000	24 horas	P0	0,0203	0,0227 $\pm$ 0,0023
16000	24 horas	P1	0,0214	
16000	24 horas	P5	0,0235	
16000	24 horas	P10	0,0256	
16000	4 días	P0	0,0254	0,0232 $\pm$ 0,0035
16000	4 días	P1	0,0267	
16000	4 días	P5	0,0189	
16000	4 días	P10	0,0218	
16000	6 días	P0	0,0352	0,0340 $\pm$ 0,0033
16000	6 días	P1	0,0378	
16000	6 días	P5	0,0301	
16000	6 días	P10	0,0327	
16000	14 días	P0	0,0235	0,0261 $\pm$ 0,0023
16000	14 días	P1	0,0245	
16000	14 días	P5	0,0303	
16000	14 días	P10	0,0259	
32000	24 horas	P0	0,0432	0,0434 $\pm$ 0,0032
32000	24 horas	P1	0,0425	
32000	24 horas	P5	0,0401	
32000	24 horas	P10	0,0470	
32000	4 días	P0	0,0435	0,0446 $\pm$ 0,0023
32000	4 días	P1	0,0473	
32000	4 días	P5	0,0421	
32000	4 días	P10	0,0456	
32000	6 días	P0	0,0659	0,0620 $\pm$ 0,0043

32000	6 días	P1	0,0623	
32000	6 días	P5	0,0559	
32000	6 días	P10	0,0637	
32000	14 días	P0	0,0524	
32000	14 días	P1	0,0578	0,0529±0,0034
32000	14 días	P5	0,0499	
32000	14 días	P10	0,0516	

Tabla Anexo 2

Resultados del test AlamarBlue para BM-MSCs en β -TCP de distintas porosidades

Número células	Tiempo	Porógeno	Absorbancia	Media±SD
8000	24 horas	P0	0,0015	
8000	24 horas	P1	0,0025	0,0019±0,0007
8000	24 horas	P5	0,0011	
8000	24 horas	P10	0,0023	
8000	4 días	P0	0,0222	
8000	4 días	P1	0,0235	0,0248±0,0029
8000	4 días	P5	0,0289	
8000	4 días	P10	0,0245	
8000	6 días	P0	0,0279	
8000	6 días	P1	0,0379	0,0307±0,0049
8000	6 días	P5	0,0299	
8000	6 días	P10	0,0271	
8000	14 días	P0	0,0756	
8000	14 días	P1	0,0789	0,0768±0,0019
8000	14 días	P5	0,0779	
8000	14 días	P10	0,0749	
16000	24 horas	P0	0,0233	
16000	24 horas	P1	0,0278	0,0259±0,0030
16000	24 horas	P5	0,0234	
16000	24 horas	P10	0,0290	
16000	4 días	P0	0,0309	
16000	4 días	P1	0,0289	0,0317±0,0027
16000	4 días	P5	0,0315	
16000	4 días	P10	0,0355	
16000	6 días	P0	0,0599	
16000	6 días	P1	0,0602	0,0566±0,0041
16000	6 días	P5	0,0523	
16000	6 días	P10	0,0539	
16000	14 días	P0	0,0803	
16000	14 días	P1	0,0820	0,0834±0,0039
16000	14 días	P5	0,0823	
16000	14 días	P10	0,0891	

32000	24 horas	P0	0,0421	0,0445±0,0033
32000	24 horas	P1	0,0475	
32000	24 horas	P5	0,0412	
32000	24 horas	P10	0,0473	
32000	4 días	P0	0,0455	0,0448±0,0024
32000	4 días	P1	0,0465	
32000	4 días	P5	0,0459	
32000	4 días	P10	0,0412	
32000	6 días	P0	0,0785	0,0814±0,0054
32000	6 días	P1	0,0895	
32000	6 días	P5	0,0795	
32000	6 días	P10	0,0782	
32000	14 días	P0	0,0835	0,0835±0,0037
32000	14 días	P1	0,0785	
32000	14 días	P5	0,0845	
32000	14 días	P10	0,0873	

Tabla Anexo 3

Resultados del test AlamarBlue para DP-MSCs en β -TCP de distintas porosidades

Número células	Tiempo	Porógeno	Absorbancia	Media±SD
8000	24 horas	P0	0,0012	0,0036±0,0033
8000	24 horas	P1	0,0022	
8000	24 horas	P5	0,0025	
8000	24 horas	P10	0,0085	
8000	4 días	P0	0,0352	0,0365±0,0019
8000	4 días	P1	0,0347	
8000	4 días	P5	0,0389	
8000	4 días	P10	0,0371	
8000	6 días	P0	0,0432	0,0489±0,0070
8000	6 días	P1	0,0499	
8000	6 días	P5	0,0584	
8000	6 días	P10	0,0439	
8000	14 días	P0	0,0789	0,0838±0,0068
8000	14 días	P1	0,0801	
8000	14 días	P5	0,0823	
8000	14 días	P10	0,0937	
16000	24 horas	P0	0,0178	0,0184±0,0010
16000	24 horas	P1	0,0195	
16000	24 horas	P5	0,0191	
16000	24 horas	P10	0,0173	
16000	4 días	P0	0,0459	0,0453±0,0021
16000	4 días	P1	0,0429	

16000	4 días	P5	0,0478	
16000	4 días	P10	0,0445	
16000	6 días	P0	0,0852	
16000	6 días	P1	0,0812	0,0870±0,0079
16000	6 días	P5	0,0986	
16000	6 días	P10	0,0828	
16000	14 días	P0	0,0807	
16000	14 días	P1	0,0982	0,0895±0,0072
16000	14 días	P5	0,0898	
16000	14 días	P10	0,0891	
32000	24 horas	P0	0,0471	
32000	24 horas	P1	0,0432	0,0469±0,0026
32000	24 horas	P5	0,0482	
32000	24 horas	P10	0,0491	
32000	4 días	P0	0,0625	
32000	4 días	P1	0,0678	0,0662±0,0028
32000	4 días	P5	0,0689	
32000	4 días	P10	0,0656	
32000	6 días	P0	0,0999	
32000	6 días	P1	0,0912	0,0958±0,0050
32000	6 días	P5	0,1002	
32000	6 días	P10	0,0917	
32000	14 días	P0	0,1037	
32000	14 días	P1	0,1025	0,1085±0,0097
32000	14 días	P5	0,1230	
32000	14 días	P10	0,1046	

Tabla Anexo 4

Resultados del test AlamarBlue para combinaciones CaP/MSC en medio cultivo estándar

Combinación CaP/MSC	Tiempo	Absorbancia
ASC+HA	24 horas	0,0285
ASC+ β -TCP	24 horas	0,0537
BM-MSC+HA	24 horas	0,0346
BM-MSC+ β -TCP	24 horas	0,0127
DP-MSC+HA	24 horas	0,0318
DP-MSC+ β -TCP	24 horas	0,0217
ASC+HA	4 días	0,0454
ASC+ β -TCP	4 días	0,0657
BM-MSC+HA	4 días	0,0350
BM-MSC+ β -TCP	4 días	0,0908
DP-MSC+HA	4 días	0,0402
DP-MSC+ β -TCP	4 días	0,0348
ASC+HA	7 días	0,0517
ASC+ β -TCP	7 días	0,0638
BM-MSC+HA	7 días	0,0537
BM-MSC+ β -TCP	7 días	0,1449
DP-MSC+HA	7 días	0,0765
DP-MSC+ β -TCP	7 días	0,0422

Tabla Anexo 5

Resultados del test AlamarBlue para combinaciones CaP/MSC en medio osteogénico

Combinación CaP/MSC	Tiempo	Absorbancia
ASC+HA	24 horas	0,0241
ASC+ β -TCP	24 horas	0,0561
BM-MSC+HA	24 horas	0,0208
BM-MSC+ β -TCP	24 horas	0,0576
DP-MSC+HA	24 horas	0,0427
DP-MSC+ β -TCP	24 horas	0,0991
ASC+HA	4 días	0,0615
ASC+ β -TCP	4 días	0,0589
BM-MSC+HA	4 días	0,0590
BM-MSC+ β -TCP	4 días	0,1117
DP-MSC+HA	4 días	0,0963
DP-MSC+ β -TCP	4 días	0,1397
ASC+HA	7 días	0,0593
ASC+ β -TCP	7 días	0,0688
BM-MSC+HA	7 días	0,0693
BM-MSC+ β -TCP	7 días	0,1557
DP-MSC+HA	7 días	0,1258

DP-MSD+β-TCP

7 días

0,2068

ANEXO II:

Publicaciones

Publicaciones realizadas durante la realización de la Tesis Doctoral no incluidas en la memoria

1. Check-control of inflammation displayed by bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis patients. Lamas JR, **Mucientes A**, Lajas C, Fernández-Gutiérrez B, López Y, Marco F, Jover JA, Abásolo L, Rodríguez-Rodríguez L. Immunotherapy. 2019 Sep;11(13):1107-1116. doi: 10.2217/imt-2019-0091. Epub 2019 Aug 5. PMID: 31378114
2. RNA sequencing of mesenchymal stem cells reveals a blocking of differentiation and immunomodulatory activities under inflammatory conditions in rheumatoid arthritis patients. Lamas JR, Fernandez-Gutierrez B, **Mucientes A**, Marco F, Lopiz Y, Jover JA, Abasolo L, Rodríguez-Rodríguez L. Arthritis Res Ther. 2019 May 6;21(1):112. doi: 10.1186/s13075-019-1894-y. PMID: 31060598
3. Functional implications of single nucleotide polymorphisms rs662 and rs854860 on the antioxidative activity of paraoxonase1 (PON1) in patients with rheumatoid arthritis. **Mucientes A**, Fernández-Gutiérrez B, Herranz E, Rodríguez-Rodríguez L, Varadé J, Urcelay E, Lamas JR. Clin Rheumatol. 2019 May;38(5):1329-1337. doi: 10.1007/s10067-018-4394-6. Epub 2018 Dec 26. PMID: 30588556
4. Differential Expression of HOX Genes in Mesenchymal Stem Cells from Osteoarthritic Patients Is Independent of Their Promoter Methylation. **Mucientes A**, Herranz E, Moro E, Lajas C, Candelas G, Fernández-Gutiérrez B, Lamas JR. Cells. 2018 Dec 5;7(12):244. doi: 10.3390/cells7120244. PMID: 30563049
5. Altered Expression of Wnt Signaling Pathway Components in Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells in Osteoarthritis Patients. Tornero-Esteban P, Peralta-Sastre A, Herranz E, Rodríguez-Rodríguez L, **Mucientes A**, Abásolo L, Marco F, Fernández-Gutiérrez B, Lamas JR. PLoS One. 2015 Sep 9;10(9):e0137170. doi: 10.1371/journal.pone.0137170. eCollection 2015. PMID: 26352263

