



Universidad de Valladolid

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
SALUD

TESIS DOCTORAL:

**REGENERACIÓN ÓSEA MEDIANTE LÁMINA DE TITANIO Y
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ESTUDIADA CON UN
NUEVO MÉTODO DE INCLUSIÓN Y CORTE**

Presentada por **Jorge Gayoso del Villar**
para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Valladolid

2024

Dirigida por:

Prof. Dr. Manuel Garrosa
Prof. Dr. Diego Fernández Lázaro

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, el profesor Gayoso por su formación continuada, ha sido un soporte e inspiración durante toda mi carrera profesional. Ejemplo de dedicación, sacrificio y entusiasmo por intentar resolver los desafíos científicos y clínicos que la naturaleza plantea.

A Iván y Sara por su colaboración en la búsqueda de fuentes bibliográficas.

A los directores por tomar el relevo de este proyecto, su paciencia y comprensión.

A Rogelio Martínez por su imprescindible ayuda siempre desde la sencillez y discreción que le caracteriza.

PUBLICACIONES

Gayoso J; Garrosa M; Gayoso S; Rodríguez-Arias C.A; Martín-Ferrero M.A. y Gayoso M.J.

Three-sectioning method: A procedure for studying hard tissues and large pieces under light and electron microscopy

Micron, 132: 102841. doi: 10.1016/j.micron.2020.102841 (2020)

Gayoso M.J; Gayoso J. y Garrosa M.

Surface alkali etching of poly-(L-lactide-co-glycolide) but not of polystyrene increases adhesion and proliferation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

Granada (España), junio de 2011.

TERMIS EU 2011 ANNUAL MEETING

“Publicada en Histology and Histopathology, 26 Suppl. 1: 224

Gayoso del Villar J; Garrosa García M. y Gayoso Rodríguez M.J.

Titanium lamina graft seeded with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells increases mandibular bone regeneration

Bilbao (España), septiembre de 2015.

VI International Congress of Histology and Tissue Engineering

“Publicada en Histology and Histopathology, 30 Suppl. 1: 85 (2015)”

Gayoso M.J; Gayoso J; Garrosa M; Jiménez P; Girbés T. y Gayoso S.

A method for embedding hard substances allowing histological studies from macroscopic to ultrastructural level

Santiago de Compostela (España), septiembre de 2017.

VII International Congress of Histology and Tissue Engineering

“Publicada en Histology and Histopathology, 32 Suppl. 1: 69 (2017)”

Gayoso J; Garrosa M; Gayoso S. y Gayoso M.J.

Multilinear differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in a model of bone regeneration

Murcia (España), septiembre de 2019.

VIII International Congress of Histology and Tissue Engineering

“Publicada en Histology and Histopathology, 34 Suppl. 1: S231 (2019)”

RESUMEN

Se ha desarrollado un nuevo método de inclusión y corte aplicado a un estudio de regeneración ósea en el que se ha valorado la idoneidad de dicho método, así como la regeneración operada en el hueso mandibular de rata tras la creación de un defecto óseo crítico (4 mm) en dicho hueso observando, en todo momento, la legislación europea y española para el uso y manejo de animales de laboratorio.

Se establecieron 4 grupos de animales: A) Control Positivo: Osteotomía subcrítica (2-3 mm); B) Control Negativo: Osteotomía crítica sin implante ni células añadidas; C) Osteotomía crítica con implante de lámina de titanio perforada; D) Osteotomía crítica con implante de lámina de titanio perforada sembrada con células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo. Los animales fueron sacrificados a los 30 días de la operación.

El nuevo método de inclusión y corte que hemos desarrollado y denominado de las tres secciones ofrece grandes ventajas para obtener secciones seriadas de tejidos duros y piezas grandes y poder estudiarlas a diferentes niveles de aumentos, permitiendo realizar sobre dichas secciones una amplia variedad de tinciones histológicas. En la presente tesis realizamos las técnicas de azul de toluidina, rojo de alizarina, Von Kossa, Fluoropaque, microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido y microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDAX).

El estudio experimental de los animales sometidos a osteotomía reveló que el grupo A (osteotomía subcrítica) regeneraba completamente el hueso, los del grupo B (control negativo) no mostraron regeneración, mientras que los de los grupos C y D (implantados con lámina de titanio) conseguían regenerar el hueso tras un mes desde la osteotomía, dándose una regeneración más completa en el grupo D debido al efecto de las células madre añadidas. El microscopio electrónico de barrido mostró una estructura trabecular del hueso neoformado y el microanálisis EDAX hidroxapatita en su matriz.

SUMMARY

A new inclusion and cutting method has been developed applied to a bone regeneration study in which the suitability of the mentioned method has been assessed, as well as the regeneration performed on rat mandibular bone after the performance of a critical bone defect (4 mm) in said bone, observing, at all times, the European and Spanish legislation for the use and management of laboratory animals.

Four groups of animals were established: A) Positive Control: Subcritical osteotomy (2-3 mm); B) Negative Control: Critical osteotomy (4 mm) without implant or added cells; C) Critical osteotomy with perforated titanium membrane implant; D) Critical osteotomy with the same implant of perforated titanium membrane seeded with adipose-derived mesenchymal stem cells. Animals were sacrificed 30 days after surgery.

The new inclusion and cutting method that we have developed and called “the three sections” offers great advantages for obtaining serial sections of hard tissues and large pieces and being very suitable to study them at different levels of magnification, allowing a wide variety of histological stains to be performed on these sections. In this thesis we performed the techniques of toluidine blue, alizarin red, Von Kossa, Fluoropaque, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, and microanalysis by energy dispersive X-rays (EDAX).

The experimental study of the animals subjected to osteotomy revealed that group A (subcritical osteotomy) completely regenerated the bone, those in group B (negative control) did not show regeneration, while those in groups C and D (implanted with titanium membrane) were able to regenerate the bone after one month from the osteotomy, with a more complete regeneration in group D due to the effect of the added stem cells. The scanning electron microscope showed a trabecular structure of the newly formed bone and EDAX microanalysis showed hydroxyapatite in its matrix.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	8
A. EL TEJIDO ÓSEO	8
1. Tipos	8
a) Compacto (denso)	8
b) Esponjoso (trabecular)	9
2. Elementos	10
a) Matriz ósea	10
b) Células	11
- Células osteoprogenitoras	11
- Osteoblastos	12
- Osteocitos	14
- Células tapizantes óseas	16
- Osteoclastos	17
- Células revertidas	18
c) Calcificación	19
d) Remodelación	20
e) Reparación de fracturas	22
f) Hueso inmaduro y hueso maduro	25
B. IMPORTANCIA CLÍNICA	26
C. INGENIERÍA TISULAR	28
1. Células	29
2. Soportes	32
a) Membranas	33
b) Rellenos	34
3. Factores	39
D. MODELOS	43
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47

III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
A. SUJETOS	48
B. ANESTESIA	50
C. OSTEOTOMÍA.....	50
D. LÁMINA DE TITANIO	51
E. CULTIVO DE CELULAS (CMMTA).....	52
F. SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS.....	54
G. METODO DE LAS TRES SECCIONES	55
1. Primera sección.....	56
2. Segunda sección	57
3. Tercera sección.....	59
H. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....	61
IV. RESULTADOS	65
➤ GRUPO A	66
➤ GRUPO B.....	66
➤ GRUPO C	67
➤ GRUPO D	71
Área D1	72
Área D2	78
Área D3	79
Área D4.....	81
Área D5	83
V. DISCUSIÓN.....	85
VI. CONCLUSIONES	97
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	98

A.INTRODUCCIÓN

A. EL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo constituye un tejido de sostén especializado del tejido conectivo denso, en el que la matriz extracelular está mineralizada, principalmente por calcio, dotándole de gran dureza, si bien manteniendo ciertas propiedades elásticas. El tejido óseo recién formado se conoce como osteoide o prehueso y aún no se encuentra calcificado.

En su estructura encontramos capas de unos 3 μm de espesor que se conocen como laminillas óseas, entre las cuales se observan unos espacios alargados llamados lagunas óseas u osteoplasmas, que se comunican con los de las laminillas contiguas mediante finísimos canalículos llamados conductillos calcóforos, que atraviesan perpendicularmente las laminillas.

1. Tipos

a) Compacto (denso):

Es el tejido propio de las diáfisis de los huesos largos y se caracteriza porque las laminillas siguen, generalmente, una distribución concéntrica alrededor de las ramificaciones vasculares sanguíneas que discurren por túneles conocidos como canales de Havers, los cuales siguen la dirección del eje longitudinal del hueso. Dichos canales se encuentran comunicados por conductos de disposición preferentemente transversal llamados conductos de Volkmann o

perforantes. Al conjunto de laminillas alrededor de un canal de Havers se le denomina sistema de Havers u osteona (Fig. 1) y, en las regiones periférica e interna de las diáfisis, las laminillas se disponen siguiendo toda la circunferencia del hueso, constituyendo las laminillas circunferenciales externas e internas, respectivamente.

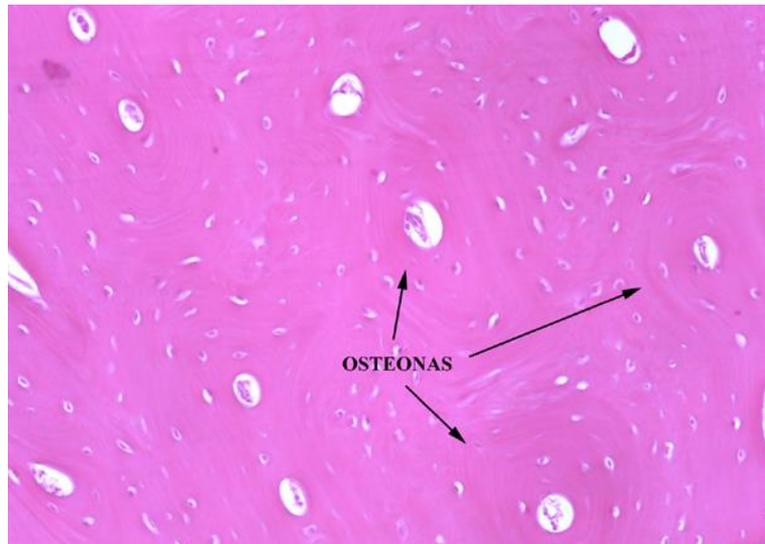


Figura 1. Tejido óseo compacto mostrando los sistemas de Havers u osteonas. Hematoxilina y eosina. x300.

En los sistemas de Havers la disposición de las fibras colágenas es paralela en cada laminilla, cambiando su orientación con respecto a la laminilla contigua. Una línea, conocida como línea de cemento, dotada de escasas fibras colágenas no calcificadas, marca el límite entre dos sistemas de Havers.

b) Esponjoso (trabecular):

En este tipo de tejido óseo las laminillas no se organizan circunferencialmente, sino formando una trama tridimensional irregular de trabéculas o espículas entre las cuales se dispone médula ósea. Es el propio del

interior de los huesos cortos y planos, así como de las epífisis de los huesos largos (Fig. 2).

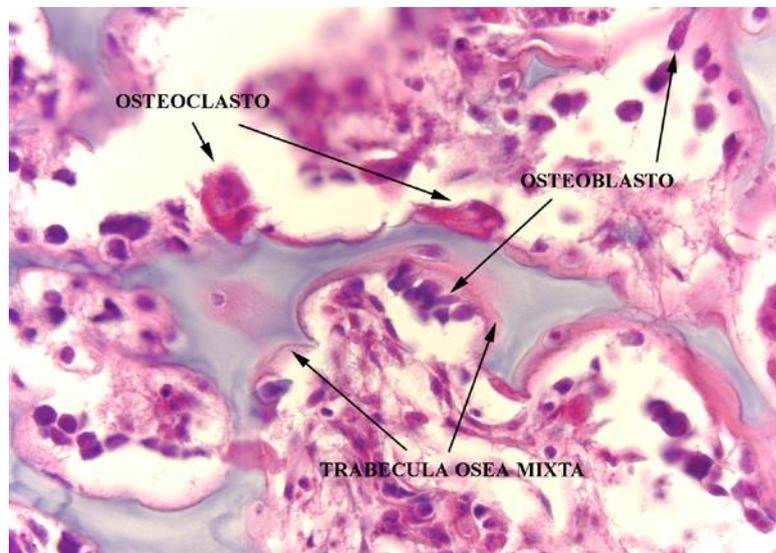


Figura 2. Tejido óseo esponjoso mostrando trabéculas no completamente osificadas, osteoblastos y osteoclastos. Hematoxilina y eosina. x850.

2. Elementos

a) Matriz Ósea

La matriz extracelular del tejido óseo consta de dos componentes: el orgánico (23%) y el inorgánico (77%).

El componente orgánico está constituido por un 88% de colágeno, principalmente de tipo I y en menor medida de tipo V, y de sustancia fundamental (amorfa) que incluye glucosaminoglicanos como el hialuronano, condroitinsulfato y queratansulfato, glucoproteínas como osteocalcina (BGP), osteonectina y osteopontina, además de varias sialoproteínas.

En cuanto al componente inorgánico o mineral lo constituye, en su mayor parte, fosfato de calcio mayoritariamente cristalizado en forma de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), con una pequeña cantidad de fosfato. El

tejido óseo contiene más del 99% del calcio del organismo. Los cristales aparecen como agujas de 3 nm de espesor y hasta 60 nm de longitud. Además, se encuentran iones magnesio, potasio, sodio, carbonato, citrato y estroncio y algunos metales pesados adsorbidos a los cristales como el plomo y el oro.

b) Células (Fig. 3)

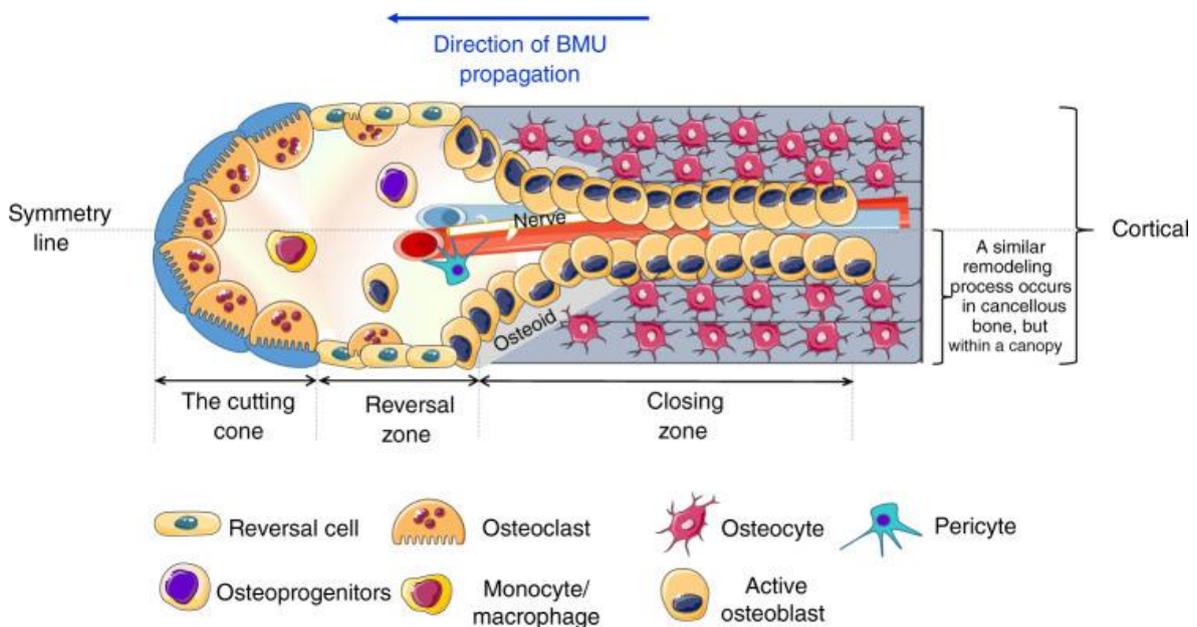


Figura 3. Esquema mostrando la unidad de regeneración ósea (BRU) con las células implicadas en el proceso. BMU: Unidad multicelular básica. (Tomado de Bolamperti et al. 2022).

- *Células osteoprogenitoras (osteogénicas)*

Son células madre provenientes de la célula mesenquimática CFU-F (Unidad formadora de colonias fibroblásticas) que, en situación de reposo, se muestran aplanadas en la capa celular (interna) del periostio y en el endotelio que tapiza las cavidades medulares y los conductos de Havers y de Volkmann.

Su núcleo es ovoide pálido y poseen un citoplasma escaso, con algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres y escaso aparato de Golgi. Durante el crecimiento y tras la fractura del hueso, estas células se activan por las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) segregadas por las células madre mesenquimales (estromales) de la médula ósea y dan origen a osteoblastos y condroblastos (Fig. 3).

Los pericitos que expresan receptor de leptina ($LepR^+$) pueden ser considerados osteoprogenitores (Delaisse et al. 2005) y ven incrementado su número por la parathormona (Caire et al. 2019). Un tipo particular de vasos sanguíneos, denominado tipo H, que están rodeados de abundantes células osteoprogenitoras expresan altos niveles de CD-31 y endomucina, y se hallan localizados tanto en la proximidad de los cartílagos de crecimiento como en el periostio y endostio. Estos vasos se ven incrementados por la liberación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas tipo BB por parte de los preosteoclastos, factor que, asimismo, induce el reclutamiento de células osteoprogenitoras.

- *Osteoblastos*

Son los encargados de producir la matriz extracelular. Se muestran como células grandes basófilas de aspecto redondeado o poliédrico irregular que presentan uniones comunicantes (tipo nexo) con las vecinas y con osteocitos. Poseen un gran desarrollo del retículo endoplásmico rugoso, un notable aparato de Golgi de disposición perinuclear, algunas mitocondrias y, entre el resto de orgánulos, destaca la presencia de las llamadas vesículas matriciales, pequeñas vesículas de 50 a 250 nm de diámetro limitadas por membrana que contienen gran cantidad de fosfatasa alcalina.

Con una vida media de unos tres meses, mantienen la capacidad de división y sintetizan tanto colágeno como la sustancia fundamental. Se disponen alineados en una fila (Fig. 3) para formar las laminillas óseas, de manera que, una vez formadas éstas, quedan confinadas en las lagunas óseas transformándose en osteocitos, los cuales muestran escasa actividad, aunque también ejercen sus funciones.

Los osteoblastos segregan colágeno I, osteonectina, osteocalcina, sialoproteína ósea, osteopontina, proteoglicanos y fosfatasa alcalina, siendo, asimismo, responsables de la calcificación de la matriz, que se inicia con el vertido de las vesículas matriciales. También secretan citoquinas y factores de crecimiento implicados en la formación y resorción del hueso, como son las interleucinas 1, 6 y 11, que estimulan la formación y activación de osteoclastos. Dicha secreción es favorecida por la parathormona y la vitamina D, vitamina que también estimula la secreción de osteocalcina por el osteoblasto. Otros factores segregados por los osteoblastos son el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), prostaglandinas como la PGE₂ -que, junto con la parathormona, estimula la producción de IGF-I-, el TGFβ (factor de crecimiento transformante β), que provoca la atracción quimiotáctica de células osteoprogenitoras y estimula la maduración y activación de los osteoblastos a la vez que inhibe la actividad de los osteoclastos.

Los osteoblastos, además, establecen una comunicación intercelular con los osteoclastos, a los cuales estimulan en su diferenciación mediante RANKL-osteoprotegerina, interleucinas 1 y 6, TNFα, M-CSF y el contacto directo a través de efedrina, semaforina 3A y vías activadoras por ligando FAS, mientras que, a su vez, los osteoclastos influyen sobre la diferenciación de los osteoblastos favoreciéndola mediante la BMP 6, la esfingosina-1-fosfato (S1-P), el PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) y la liberación de la matriz extracelular durante la resorción de TGFβ₁ y IGF-1 inhibiendo

dicha diferenciación mediante la secreción de semaforina 4D (SEMA 4D) (Kim et al. 2020).

Los osteoblastos pueden pasar a la circulación sanguínea y colonizar otros huesos que requieran reparación (Kuznetsov et al. 2001).

- *Osteocitos*

Como hemos dicho, el osteocito es el osteoblasto confinado en el osteoplasma y con escasa actividad. Poseen un núcleo elíptico con escaso citoplasma alrededor y de 50 a 100 finas expansiones citoplásmicas (Fig. 3) que penetran por los conductillos calcóforos hasta establecer uniones comunicantes entre sí y con osteoblastos, a través de las cuales envían señales para la remodelación ósea en virtud, al parecer, de la capacidad de los osteocitos para detectar cambios piezoeléctricos. Se establece así una red protoplásmica tridimensional que no rebasa la línea de cemento.

Presentan una vida media de unos 25 años (Frost, 1963) y representan más del 90% de las células óseas del adulto, unos 42.000 millones (Boenzli y Sims, 2015) y se han distinguido tres tipos según el momento funcional: 1) Latentes, con escasos retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi; 2) Formativos, que segregan osteoide dentro del osteoplasma y poseen ciertas características que recuerdan a los osteoblastos; y 3) Resortivos, con abundante retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, así como visibles lisosomas, que por estímulo de la parathormona, llevan a cabo la denominada osteólisis osteocítica, que libera calcio para aumentar la calcemia.

Los osteocitos pueden inhibir la osteoblastogénesis y estimular la osteoclastogénesis mediante la secreción de esclerostina (SOST) (Winkler et al. 2003).

El líquido extracelular óseo es particular y su flujo se ve inducido por las tensiones mecánicas ejerciendo una acción sobre los mecanorreceptores de los osteocitos (Qiu et al. 2020). Las modificaciones de este flujo de líquido extracelular pueden ser captadas por los osteocitos mediante los siguientes mecanismos: 1) Protrusiones colágenas, que son proyecciones de matriz colágena en los conductillos calcóforos que se unen directamente a las prolongaciones del osteoclasto; 2) Integrinas β_1 y β_3 , que participan en la formación del complejo de kinasa de adhesión focal en las prolongaciones del osteocito; 3) Cilios primarios, dotados de capacidad sensorial para el flujo, que promueven el aumento de osteoprotegerina en relación con el ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa B (RANKL) mediante un mecanismo independiente de calcio; 4) Conexina 43, componente de las uniones comunicantes o tiponexo, que media la transducción de señales mecánicas; y 5) Canales iónicos mecanosensitivos, como los compuestos de Piezo 1, altamente sensibles a la tensión del plasmalema del osteocito (Qin et al. 2020).

La deformación del citoesqueleto del osteocito produce la entrada de calcio vía activación de TRPV4, lo que conlleva contracciones de la membrana celular que favorecen la producción y liberación de vesículas extracelulares que contienen mediadores intercelulares de información (Colombo et al. 2014).

Las señales mecánicas activan la vía Wnt en el hueso mediante la supresión de esclerostina –antagonista del receptor Wnt- (Sato et al. 2020). Los osteocitos también disminuyen la expresión de esclerostina ante una disminución de oxígeno (Slegten et al. 2018).

La secreción de la proteína WNT estimula la célula diana, de manera que ello estabiliza la β -catenina en el citoplasma, la cual se transloca al núcleo, donde induce la expresión de genes relacionados con la osteogénesis (Karner y Long, 2017). La señalización de WNT- β -catenina en osteoblastos y osteocitos

reprime indirectamente la diferenciación osteoclástica y resorción ósea al estimular la secreción de osteoprotegerina (Baron y Kneissel, 2013).

Los osteoclastos pueden estimular a osteoblastos sin necesidad de que haya resorción ósea (Osteoclastos anabólicos). Esta actividad anabólica acoplada con los osteoblastos se ha comprobado con el incremento de ARNm en los osteoblastos co-cultivados con osteoclastos (Luo et al. 2016) y el reclutamiento de precursores osteoblásticos (Sims y Martin, 2020).

- *Células tapizantes óseas*

Son células aplanadas con escaso citoplasma que se localizan en las trabéculas quiescentes, en endostio, superficie endocortical y al final de la formación del hueso. Proviene de la diferenciación terminal de los osteoblastos y mantienen contactos funcionales con éstos, con los precursores de osteoclastos y con los osteoclastos mediante moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1).

Recubren las superficies del hueso interponiendo, mediante uniones estrechas, una barrera iónica entre el hueso y el líquido extracelular sistémico en la homeostasis del calcio. Muestran positividad a marcadores de osteoblastos, como son la fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteonectina.

Se encuentran recubiertas por un estrato de células derivadas del mesénquima llamado envoltura de médula ósea, también con propiedades osteoprogenitoras (Delaisse et al. 2020), que constituye el dosel que separa los osteoclastos de los osteoblastos de la médula ósea, generando así el compartimento de remodelación ósea, pudiendo a su vez digerir restos de fibrillas colágenas (Fig. 3).

- *Osteoclastos*

Son células gigantes multinucleadas (Fig. 3), con núcleos ovoides de cromatina laxa y uno o dos nucleolos. Su citoplasma es eosinófilo y se halla dotado de varios dictiosomas, numerosas mitocondrias y lisosomas con fosfatasa ácida resistente a tartratos (TRAP) -útil como marcador para estas células- además de otras hidrolasas, colagenasa y ácidos orgánicos. Poseen una vida media de unas dos semanas (Manolagas, 2000). En algunos osteoclastos se observa un citoplasma espumoso y, en el borde orientado hacia el hueso, un ribete fruncido constituido por profundos pliegues, entre los cuales se distinguen cristales de hidroxapatita. El hueso de la zona próxima al osteoclasto aparece horadado en forma semilunar como resultado de la actividad lítica sobre la matriz, recibiendo este espacio creado el nombre de laguna de Howship.

La zona de activación aparece sellada en forma de anillo a consecuencia de las uniones del plasmalema a la matriz mediante moléculas de adhesión celular, creándose un espacio subosteoclástico donde se liberan las enzimas lisosomales, debiendo estar mineralizada la matriz para que el osteoclasto actúe. En su acción, el osteoclasto segrega HCl y proteasas como la catepsina K, TRAP y metaloproteínas. La matriz extracelular es endocitada y tras su ulterior degradación intracelular, exocitada por la cara basolateral. La interacción con la matriz está mediada por el complejo integrina $\alpha 5 \beta 3$, que reconoce motivos RGD en proteínas tales como fibronectina, osteopontina y sialoproteínas óseas.

Su activación por la parathormona es indirecta ya que no poseen receptores para ella y, como se dijo antes, esta hormona paratiroidea actúa sobre los osteoblastos, quienes mediante la secreción principalmente de las interleucinas 1, 6 y 11 activan a los osteoclastos. La calcitonina, sin embargo, sí actúa

directamente inhibiendo a los osteoclastos al unirse a receptores que éstos poseen para ella.

Los osteoclastos se forman por fusión de preosteoclastos, células precursoras presentes en el tejido óseo TRAP positivas provenientes de la célula madre CFU-GM del tejido hematopoyético, que también da lugar a granulocitos neutrófilos y monocitos. El factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF) segregado por osteocitos y células endoteliales constituye el estímulo, junto al RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear K_B), para que la CFU-GM siga la línea de diferenciación a osteoclastos, estando mediada la fusión de las células mononucleares por la proteína transmembrana DL-STAMP (Verma et al. 2018).

En el compartimento de remodelación ósea, la WNT-5a de los osteoblastos primero favorece la osteoclastogénesis y después, a medida que los precursores osteoclásticos se diferencian, la WNT-5a aumenta, llevando a un subsiguiente incremento de la fusión de osteoclastos y de su actividad. En estadios posteriores, la producción de WNT-5a por osteoclastos maduros favorece la osteoclastogénesis ya que WNT-5a coopera con la señalización Wnt canónica y, en consecuencia, este incremento de osteoblastos puede rellenar la cavidad reabsorbida en el momento adecuado. Los osteoclastos pueden ser reciclados a **osteomorfos**, que son osteoclastos altamente móviles que permanecen en la médula ósea adyacente y retienen la capacidad de volver a fusionarse en osteoclastos funcionantes.

- *Células revertidas*

Son células mononucleares que colonizan las lagunas de Howship tras la acción de los osteoclastos cubriendo la matriz no mineralizada no digerida (Dempster et al. 2013). Carecen de marcadores específicos, aunque son

positivas a algunos marcadores del linaje osteoblástico, y pudieran originar osteoblastos con capacidad de digerir restos de fibrillas colágenas al igual que las células tapizantes óseas (Fig. 3).

c) Calcificación

La mineralización del hueso también se conoce como calcificación al ser el calcio el principal mineral implicado. El calcio en el osteoide está en equilibrio con el calcio ionizado de la sangre, modificándose su concentración en función de los requerimientos homeostáticos, por lo que a este osteoide se lo conoce también como hueso metabólico o lábil, en contraposición con el hueso estructural, calcificado por completo, cuyo calcio sólo puede ser movilizado en el proceso de resorción. En el osteoide el colágeno se relaciona con menos glucoproteínas que en el tejido calcificado.

Para que tenga lugar la calcificación la concentración de Ca^{++} y PO_4^{3-} debe superar el nivel umbral normal. La osteocalcina y otras sialoproteínas fijan el calcio creando una concentración local extracelular alta, lo cual estimula a los osteoblastos para que segreguen la fosfatasa alcalina, con lo que aumenta la concentración local de PO_4^{3-} y esto, a su vez, favorece el incremento de la concentración de Ca^{++} . Ante estas altas concentraciones de Ca^{++} y PO_4^{3-} , los osteoblastos liberan las vesículas matriciales, con fosfatasa alcalina y pirofosfatasa, que escinden los iones PO_4^{3-} de otras moléculas de la matriz y todo ello provoca el aumento del punto isoelectrico local conllevando a la cristalización del fosfato cálcico en las vesículas matriciales circundantes dando lugar a la formación de los cristales de hidroxiapatita, que van creciendo con rapidez por acreción y depositándose sobre las fibrillas colágenas, e incluso dentro de éstas, mineralizando la matriz.

Una mineralización primaria ocurre a los 3-4 días y comprende el 80% del total, para llegar a completarse más lentamente a los 3 ó 4 meses en una mineralización secundaria durante la cual los cristales de hidroxapatita crecen.

d) Remodelación

Ya se ha evidenciado que el hueso, con su tejido óseo y demás componentes que lo integran, es una estructura viva que, como le corresponde, se adapta a los requerimientos de las variaciones ambientales y da muestras claras de reestructuración o remodelación a pesar de su apariencia recia y estable, como ya señaló Wolf en 1892 y fue magistralmente aplicado en la clínica traumatológica y ortopédica por Trueta a mediados del siglo pasado (Trueta, 1976). Se ha calculado que 9,1 millones de osteocitos son reemplazados diariamente durante la remodelación y descrito mecanosensibilidad en osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células tapizantes óseas, además de en plaquetas, miocitos, fibroblastos, condrocitos y células endoteliales (Ma et al. 2023).

Para llevar a cabo dicha remodelación deben actuar antagónica pero coordinadamente osteoclastos y osteoblastos, ejerciendo uno la resorción y el otro la formación del tejido óseo en la conocida como Unidad Remodeladora Ósea (BRU) (Fig. 3) (Bolamperti et al. 2022).

El líquido intercelular del espacio subosteoclástico tiene un pH de aproximadamente 4 a consecuencia del bombeo de protones ejercido por una ATPasa de su plasmalema, la cual activa las enzimas que conducirán a la desintegración de la matriz. Asimismo, se ha descrito también en el osteoclasto la presencia de anhidrasa carbónica en el citoplasma del osteoclasto próximo al borde fruncido, que libera protones por disociación del ácido carbónico.

Se distingue un cono de corte o conducto de resorción por el que avanzan los osteoclastos abriendo la cavidad de resorción seguidos de capilares, pericitos y osteoblastos, y un cono de cierre. La cavidad de resorción se muestra como conductos alargados en los que los osteoclastos eliminan todos los restos para que las células osteoprogenitoras de la superficie interna de la cavidad originen osteoblastos y procedan a la formación de nuevas laminillas óseas. Tras la resorción se cierra la superficie ósea libre con una línea de cemento, adaptándose así las osteonas o trabéculas a las líneas de fuerza que demandan las necesidades del individuo.

La remodelación ósea está influida por 2 factores principales liberados por la matriz extracelular: $TGF\beta$ e IGF-I, que favorecen el reclutamiento y diferenciación del linaje de células osteoblásticas, así como la mineralización, y regulan la actividad osteoclástica, por lo que se las denomina factores de acoplamiento. La microbiota también es un factor influyente (Lyn et al. 2023) y nuevos estudios están aportando evidencias que sugieren que también los macrófagos (OsteoMacs) y otras células de linaje mieloide están implicadas en la remodelación ósea (Weivoda y Bradley, 2023). Y, asimismo, la secreción del factor osteoclastogénico de los linfocitos T activados (SOFAT) juega un papel esencial en la remodelación ósea, como se ha comprobado en la artritis reumatoide y en la periodontitis (Zhang et al. 2022).

Las moléculas guía neuronales, como las netrinas, siltas, semaforinas, efrinas y receptores Eph también juegan un papel en la homeostasis del hueso (Seu y Erber, 2022). Asimismo, se ha descrito que el factor inducible por hipoxia 1α juega un papel central en la regulación de la formación de hueso y cartílago, induciendo la invasión vascular y la diferenciación de células osteoprogenitoras, de manera que media la respuesta adaptativa de las células a los cambios en los niveles de oxígeno (You et al. 2022) y, por su parte, el FTY720 incrementa las células inmunitarias pro-regenerativas como

neutrófilos, macrófagos y monocitos, así como la vascularización, proliferación celular y depósito de colágeno favoreciendo la regeneración ósea, muscular y de mucosas primariamente mediante el control de células inmunitarias locales; de tal manera que se reduce el componente inflamatorio del proceso de curación y se incrementa la migración de células pro-regenerativas como neutrófilos y macrófagos a la zona (Behava y Goudy, 2023). Finalmente, se han descrito factores derivados de la neurona como SEMA3A, sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), secretoneurina, espresina, neuropéptido Y y VIP, que muestran un papel destacado en la regeneración craneofacial (Asefa, 2023).

e) Reparación de fracturas

Tras una fractura, como ocurre con otras heridas, los neutrófilos son los primeros en llegar al foco de la lesión seguidos de los macrófagos, que comienzan a limpiar de restos la escena. A continuación, proliferan los capilares y los fibroblastos invaden el lugar formando el llamado tejido de granulación, que va rellenando la brecha.

A cada lado de la línea de fractura se produce la necrosis de osteocitos por isquemia, al igual que ocurre en cierta medida en el tejido perióstico y en la médula ósea. A los dos días, suele reconocerse bien el límite irregular entre el hueso muerto y el vivo. Se produce, entonces, una gran proliferación de las células osteoprogenitoras, sobre todo desde la capa osteogénica (interna o celular) del periostio próximo a la fractura; y unos días más tarde, también del endostio, que darán lugar al callo externo e interno, respectivamente.

La proliferación de las células osteoprogenitoras del periostio conforman el callo externo a modo de collar alrededor de la fractura, encontrándose también en dicho callo proliferación de vasos, sobre todo en la zona más profunda del

callo, por lo que las células osteoprogenitoras de este nivel, al encontrarse más oxigenadas, se diferencian a osteoblastos, que producen trabéculas óseas, en tanto que en la zona externa, menos irrigada, la diferenciación de las células osteoprogenitoras es hacia condroblastos para formar cartílago. En los huesos largos los capilares y células osteoprogenitoras de la zona fracturada proliferan desde los extremos de los fragmentos a partir de los conductos de Havers, contribuyendo así al callo interno, que se forma desde dichos extremos para constituir un puente entre ambos mediante trabéculas en la cavidad medular.

Aproximadamente a la semana, pueden distinguirse tres capas en el callo externo: células osteoprogenitoras proliferantes, cartílago y trabéculas óseas unidas al hueso preexistente, para ir produciéndose la fusión de los callos externo e interno. El callo cartilaginoso es sustituido finalmente por hueso formando un callo de tejido óseo esponjoso.

La matriz de hueso muerto es excavada con lentitud por los osteoclastos (excepto donde las nuevas trabéculas han quedado fijadas) y los osteoblastos que colonizan las oquedades creadas darán lugar a la formación de nuevo hueso. El callo óseo se va remodelando paulatinamente perdiéndose las trabéculas periféricas una vez fortalecida la zona central con hueso nuevo. El callo externo puede desaparecer después de unas 16 semanas.

La fijación interna de la fractura mediante placas u otros medios metálicos favorece en gran medida la consolidación, evitando el callo externo.

La primera unión lograda entre los fragmentos de un hueso largo es hueso inmaduro, que posteriormente se verá atravesado por osteonas que cruzan desde un fragmento a otro insertando a ambos, para a continuación irse poblando de nuevas osteonas, lo cual requiere mucho tiempo y la remodelación completa será inspirada por el movimiento de esa región, durando el proceso entre 6 y 12 semanas.

Una fractura, por ejemplo, en la diáfisis de un hueso largo, que mantiene unidas las superficies fracturadas, puede formar un coágulo que se transformará en un tejido de granulación, el cual, si las condiciones son favorables, evoluciona a tejido conjuntivo denso, fibrocartílago y callo fibrocartilaginoso. Simultáneamente, a partir del periostio y del endostio, se diferencian los osteoblastos que forman en las zonas periféricas de la fractura, hueso neoformado. La evolución del callo fibrocartilaginoso es similar a la osificación endocondral de las diáfisis de los huesos largos, es decir, pierde progresivamente las células cartilaginosas depositándose sales minerales sobre sus restos. Cuando toda la zona de cartílago se ha transformado en hueso, comienza la remodelación de la zona de fractura reorganizándose tanto la zona medular de hueso esponjoso como la cortical de hueso compacto.

El proceso regular de reparación de un defecto óseo, fractura, cirugía, exéresis tumoral, etc., como vemos, es similar a la osteogénesis y, por lo tanto, puede repararse la lesión ósea mediante procesos similares a los de la osificación endocondral o a los de la osificación membranosa.

El mecanismo de la diferenciación osteogénica parece estar controlado durante el desarrollo embrionario por las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), que inducen en las células mesenquimales la activación de un factor de transcripción denominado factor alfa de unión central-1 (CBA1) (Hall, 1988). Este factor, al parecer, activa los genes que codifican diversas proteínas de la matriz ósea extracelular, como son la osteocalcina y la osteopontina (Komori et al. 1997). Así pues, las BMPs, la osteocalcina y la osteopontina podrían participar en la reparación de las lesiones del tejido óseo.

f) Hueso Inmaduro y Hueso Maduro

H. Inmaduro

Posee mayor celularidad que el maduro, distribuyéndose sus células irregularmente, en tanto que su matriz extracelular contiene mayor proporción de sustancia fundamental.

Persiste en el adulto en los alveolos dentarios -lo que permite las correcciones ortodónticas-, cerca de las suturas craneales, en el laberinto óseo y junto a inserciones tendinosas y ligamentosas -donde se mezcla con el hueso maduro- y en las regiones de regeneración y reparación óseas.

Se distinguen dos variedades:

Hueso tejido (de malla)

Presenta haces de fibras colágenas dispuestos en diferentes direcciones en una sustancia fundamental con mayor porcentaje de glucosaminoglicanos y glucoproteínas que el maduro, lo que le confiere basofilia. Asimismo, contiene mayor contenido de calcio que los otros tipos.

Hueso en haces

Presenta haces gruesos de fibras colágenas, que pueden correr paralelas, y osteocitos entre ellas, mostrando una mayor proporcionalidad de células.

H. Maduro (Laminado)

Presenta mayor regularidad en la disposición de las células con osteoplasmas más estrechos que en el hueso inmaduro. Va añadiendo nuevas capas de 4 a 12 μm de espesor a la superficie ósea, disponiéndose las fibrillas colágenas de cada capa formando ángulo con las de las capas adyacentes. Posee

mayor cantidad del cemento mineral en detrimento de una menor proporción de células.

B. IMPORTANCIA CLÍNICA

Como se ha señalado, el tejido óseo, al igual que otros tejidos biológicos, posee una importante capacidad de regeneración (Rentsch et al 2012) que se halla en la base de la fisiología, patogenia y terapia de numerosos procesos de especialidades biosanitarias tales como la traumatología, la ortopedia o la odontología. Dicha capacidad de regeneración del tejido óseo, no obstante, es limitada y varía con numerosos factores como el tipo de hueso, zona, edad, etc. (Zingerwenger et al. 2013), de manera que la regeneración ósea puede fracasar en una zona si se produce una lesión mayor que su capacidad regenerativa. En este caso, si las características del micromedioambiente son desfavorables, se produce inestabilidad mecánica y la lesión no cura espontáneamente, haciéndose necesaria la intervención quirúrgica (Perry et al. 1989).

En relación con los huesos de origen mesenquimático, como el que es objeto de nuestro estudio, se han venido utilizando como modelo de la evolución general de la reparación de una lesión los estudios experimentales y comparativos de la reparación de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico (4 mm) en rata (Barrientos et al. 2020), así como los estudios de Chin et al. (2013), quienes, además de un tamaño crítico de 5 mm, realizaron comparaciones con osteotomías subcríticas (2 mm), observando estos últimos autores que la regeneración ósea es un proceso similar al desarrollo embrionario del tejido óseo, pero sin llegar a reparar totalmente la lesión ni de 5 ni de 2 mm hasta los 90 días de postoperatorio estudiados. En el segundo y tercer día postoperatorio hallaron restos celulares, fibrina y necrosis en la zona central de

la lesión con osteogénesis reactiva en la periferia y con producción desorganizada de colágeno. En el quinto día los autores de este estudio encontraron células gigantes, fibrosis, angiogénesis y osteocitos en el área central rodeados por la matriz celular del hueso inmaduro. Durante los días 10° y 15°, los autores observan una capa de hueso trabecular neoformado con progresivo engrosamiento, reducción de osteoblastos activos y deposición laminar de colágeno. Desde el día 30° postoperatorio hasta el 90° los márgenes del defecto presentan una estructura de hueso compacto con sistemas haversianos y osteocitos (Chin et al. 2013).

Al tamaño a partir del cual la lesión ósea no cura espontáneamente se le denomina “Tamaño Crítico” (TC). Como ejemplo de estudios del tamaño crítico en el tejido óseo, podemos considerar el realizado por Zingerwenger et al. (2013). Estos autores establecieron que, en el fémur de ratones, defectos óseos de 3 mm de diámetro no curan espontáneamente, mientras que los defectos de 2 mm cierran aproximadamente en un 38% y el cierre en los defectos de 1 mm se aproxima al 62%.

Los defectos óseos mayores que el tamaño crítico, grandes defectos ortopédicos, u otras condiciones desfavorables, como hemos mencionado anteriormente, hacen necesario el implante quirúrgico de un soporte que posibilite e incluso favorezca la curación de la lesión ósea mediante la formación de hueso nuevo. Numerosos estudios experimentales muestran que la existencia de una separación entre el tejido receptor y el implante disminuye la cantidad de hueso regenerado. Se ha calculado una disminución de hasta 6 veces con 2 mm de separación, llegando a impedir el crecimiento óseo cuando la separación entre el implante y el receptor es de 3 mm o más.

En la implantología oral, la mejor recuperación de un defecto óseo se obtiene mediante el implante de hueso autólogo, independientemente de la zona de la que proceda dicho implante. El implante autólogo no produce reacción

inmunitaria y además posee las mejores características en todos los aspectos de la regeneración ósea, por lo que este método está considerado, en la actualidad, como la regla de oro (gold standard) ya que con él se ha obtenido la mejor recuperación de un defecto óseo, combinando propiedades osteoconductoras, osteoinductivas e inflamatorias, con liberación de citoquinasprop. Sin embargo, el trasplante autólogo de hueso tiene varios inconvenientes entre los que destacan la morbilidad, la escasez del material, el aumento del riesgo de infecciones y el incremento de la intervención quirúrgica (Camedella et al. 2007; Orona et al. 2008; Rentsch et al. 2012).

El material de relleno más utilizado por los clínicos en la cavidad oral mediante la técnica regeneración ósea guiada (GBR: guided bone regeneration) es el llamado “Composite Graft” compuesto por un 50% de partículas de hueso autólogo y otro 50% de mineral de hueso bovino desproteinizado (DBBM) (Buser et al. 2023).

C. INGENIERÍA TISULAR

La Ingeniería Tisular es una especialización de la Histología que intenta producir, con fines terapéuticos, órganos y tejidos para ser implantados en sustitución de los elementos dañados o enfermos o favoreciendo la reparación de éstos. Los elementos que se deben considerar en la construcción de un implante son: las células, en este caso células osteogénicas y osteoclasticas; los soportes o andamiajes, donde se situarán las células; y los factores que modifican o controlan el comportamiento biológico del constructo. La neoformación ósea requiere la actuación coordinada de estos tres elementos. En primer lugar, las células pluripotenciales se diferenciarán en células del tejido óseo con capacidad de proliferar (Burg et al. 2000; Giannoubis et al.

2005); en segundo lugar, es necesaria la presencia de un sustrato adecuado para la adherencia y la proliferación de las células; y, en tercer lugar, en los procesos de reparación tisular participan factores que controlan la formación, mantenimiento y desarrollo del implante; así por ejemplo, en el caso del tejido óseo, la osteocalcina, osteopontina, interleucinas y proteínas morfogenéticas óseas, entre otros.

1. Células

Las células que se utilizaron en los primeros estudios de los implantes óseos solían proceder de la diferenciación de células madre mesenquimales obtenidas de la médula ósea. Estas células pueden diferenciarse en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, o bien en células precursoras de éstas, que interaccionarán con los soportes y con los factores de control que en conjunto determinarán la reparación del tejido óseo.

En la actualidad se están estudiando numerosas aplicaciones de las células madre para curar o mejorar una gran variedad de enfermedades; sin embargo, los conocimientos que poseemos sobre los mecanismos de control de la diferenciación celular todavía son insuficientes para aprovechar las posibilidades que ofrecen estas células.

Las células madre pueden ser, según su procedencia, embrionarias o adultas. La célula madre embrionaria por excelencia es el cigoto que puede generar los órganos embrionarios y extraembrionarios, son por tanto células totipotentes. Las células madre embrionarias, por ejemplo, las del blastocisto, tienen un gran potencial de diferenciación, pueden dar lugar a cualquier tejido, son pluripotentes y tienen una gran capacidad de proliferación. Como principales inconvenientes se pueden considerar la posibilidad de producir

tumores, su rechazo inmunológico al ser heterólogas y los problemas éticos derivados de su procedencia embrionaria. Las células madre adultas están presentes en los tejidos completamente desarrollados que encontramos en la vida postnatal y pueden ser unipotentes, como las espermatogonias, o pluripotentes como las de la médula ósea. También existe la posibilidad de reconvertir células diferenciadas en células madre, conocidas como células madre inducidas o iPS (Takahashi y Yamanaka, 2006).

De la médula ósea se obtienen dos poblaciones de células madre: las hematopoyéticas y las mesenquimales. Las células madre mesenquimales de la médula ósea son células pluripotentes y pueden generar todos los tejidos mesodérmicos y mediante el proceso, actualmente controvertido denominado transdiferenciación, otros tejidos como el tejido nervioso. En relación con la patología del tejido óseo, se han utilizado células madre mesenquimales con capacidad para diferenciarse en osteoblastos (Bruder y Caplan, 2000; Ringe et al. 2003) junto con diferentes tipos de soporte.

Lo más sencillo e inmediato es utilizar células madre mesenquimales de la médula ósea procedentes del mismo paciente. La obtención de estas células tiene varios inconvenientes, como son la dificultad técnica del procedimiento, el dolor que produce la biopsia ósea y la escasa cantidad de células madre que se obtienen (Zuk et al. 2001). Una posible solución a estos problemas sería el implante de células osteoprogenitoras obtenidas a partir de células madre del tejido adiposo.

El tejido adiposo, como la médula ósea, deriva del mesodermo embrionario y posee además de adipocitos y células madre del tejido adiposo, células procedentes de los vasos que posiblemente incluyan un tipo específico de células madre, fibroblastos o adipoblastos. Estos adipoblastos, en sus primeras etapas de diferenciación, no se distinguen morfológicamente de los fibroblastos.

Se ha demostrado que las células madre mesenquimales del tejido adiposo (CMMTA) son capaces de proliferar activamente, mantener una población de células indiferenciadas y generar estirpes celulares diferenciadas. De esta forma las CMMTA pueden diferenciarse en numerosos tipos de células de estirpe mesodérmica como por ejemplo adipocitos, condrocitos, osteoblastos y mioblastos (Zuk et al. 2002; Barrientos et al. 2020).

En relación con las células madre de la médula ósea, las del tejido adiposo presentan las ventajas de que su obtención es más sencilla, menos dolorosa, el riesgo de complicaciones quirúrgicas es menor, se puede obtener mayor cantidad y la aceptación por el paciente es más fácil. La capacidad de proliferación y diferenciación de las CMMTA es, cuando menos, similar a las de la médula ósea (de Ugarte et al. 2003) y se ha estudiado su regulación epigenética hacia la diferenciación osteogénica (Wang et al. 2023).

Con CMMTA sembradas sobre un andamiaje de ácido poliláctico-co-glicólico cubierto con hidroxiapatita se consiguió reparar pérdidas óseas de un tamaño mayor que el tamaño crítico (Cowan et al. 2004). Implantando este tipo de células junto con hueso esponjoso, Lendeckel et al. (2004) consiguieron reparar defectos de los huesos craneales producidos por traumatismo en un niño de 7 años. Sobre un soporte tridimensional de hidroxiapatita y fosfato tricálcico las CMMTA son capaces de generar tejido óseo cuando se implantan subcutáneamente en ratones inmunodeficientes (Hicok et al. 2004).

Cultivando células progenitoras del tejido conectivo sobre láminas de polidimetilsiloxano, Mata et al. (2007) demuestran que el crecimiento y la morfología de las células progenitoras varían según la textura del soporte donde crece y de forma similar sobre las superficies de titanio lisas o rugosas.

Los osteoblastos humanos SAOS-2 aumentan la secreción de decorina, osteopontina y colágeno I. La estimulación con 2 mT y 75 Hz produce un efecto

similar al depósito superficial de hidroxapatita siendo incluso más efectivo este último tratamiento en cuanto a la secreción de elementos estructurales de la matriz extracelular (Fassina et al. 2010).

Las evidencias de diferenciación de células madre mesenquimales en células del tejido óseo, cuando las células madre se depositan sobre tejido óseo preexistente no son muy sólidas ni muy numerosas. Sin embargo, sí que hay una fuerte evidencia de diferenciación de células madre mesenquimales en células del tejido óseo en zonas ectópicas como tejido celular subcutáneo o tejido muscular (Kusuma et al. 2015).

2. Soportes

Con relación al hueso, los soportes pueden permitir tres fenómenos complementarios: Osteoinducción, Osteoconducción y Osteointegración.

La **Osteoinducción** se refiere básicamente a la capacidad que tiene una sustancia de producir la estimulación de las células primitivas pluripotentes, para desarrollar células de estirpe osteogénica y mantener una población de células madre. Se suele considerar que la osteoinducción produce, mediante el estímulo soluble adecuado, un reclutamiento de células osteoprogenitoras, que se diferencian en células del tejido óseo (Albrektsson y Johansson, 2001). La inducción produce una transformación en preosteoblasto que viene a ser la verdadera inducción. El fenómeno de la osteoinducción puede ser realizado en órganos que no poseen tejido óseo, dando lugar a una formación ectópica de hueso, habiéndose comprobado que el agente inductivo son las glicoproteínas solubles BMPs, que pertenecen al grupo de los factores de crecimiento transformantes. La osteoinducción es un proceso que fomenta las mitosis de células mesenquimales perivasculares produciendo la formación de células

osteoprogenitoras, como ocurre, por ejemplo, cuando actúa el factor de crecimiento transformante ($TGF\beta$).

La **Osteoconducción** es un término que complementa al anterior y consiste en el crecimiento de las células óseas sobre una superficie, que lógicamente sea compatible, acompañadas de capilares neoformados y tejidos perivasculares. También este proceso explica cómo las células óseas pueden penetrar en el interior de una estructura tridimensional con huecos en su interior. La Osteoconducción no diferencia entre conducción y el crecimiento celular que puede propulsarla.

La **Osteointegración** es empleada para definir un contacto directo entre el hueso y un implante. La Osteointegración es también el anclaje directo de un implante por la formación de tejido óseo alrededor del implante, sin que se genere un tejido fibroso en la interfaz material-hueso. Esta definición se basa en la imagen de la microscopía de luz, por lo tanto no puede ser diagnosticada o estudiada en la clínica y ha de ser sustituida por el estudio de la rigidez de la fijación mediante métodos físicos. La rigidez de esta fijación puede medirse mediante radioestereofotogrametría, que determina la resistencia de la unión entre los dos elementos.

Podemos clasificar los soportes en dos tipos según su función dentro del defecto:

a) Membranas:

El objetivo de la membrana es crear un ambiente favorable para el crecimiento óseo (Schenk 1994) proporcionando un espacio físico separando los tejidos blandos que lo pudieran ocupar, favoreciendo así la colocación del coágulo de sangre al que las células osteogénicas puedan migrar, excluir las células no osteogénicas y permitir la acumulación de factores osteogénicos.

Muchas de estas membranas necesitan sistemas de fijación sobre todo cuando el área a regenerar es bastante amplia.

Las membranas pueden ser no reabsorbibles como el politetrafluoroetileno (PTFE) o el titanio, o reabsorbibles. Las primeras tienen el inconveniente de necesitar una segunda cirugía para ser retiradas y pueden tener complicaciones y fracasar si se contaminan. El PTFE fue el primer material utilizado con éxito desde los años 80 (Gottlow 1983).

Las membranas reabsorbibles como el colágeno pueden ser más fáciles de colocar en pequeños defectos, pero no tienen solidez suficiente en el caso de defectos verticales maxilares. Otras membranas reabsorbibles son las de ácido poliláctico coglicólico cuyo manejo es más complicado.

b) Rellenos:

Surgieron como solución para evitar que las membranas colapsasen manteniendo el volumen marcado por éstas y dando solidez al coágulo. Entre los materiales de relleno podemos encontrar el hueso autólogo, fosfato tricálcico, hueso bovino desproteínizado, hidroxiapatita o plasma rico en plaquetas (PRP), todos ellos con distintas características osteoinductivas y osteoconductoras. También se debe tener en cuenta su capacidad de ser reemplazado posteriormente en el proceso de remodelación ósea.

En la reconstrucción de lesiones del tejido óseo mayores del tamaño crítico es necesaria la utilización de algún tipo de soporte que posibilite y potencie la regeneración ósea. Asimismo, se ha de tener presente que, si se añaden células al soporte, éste debe favorecer la adhesión, proliferación y diferenciación de éstas.

Los materiales con los que se construyen estos puentes han de ser biocompatibles y son principalmente cerámicas, metales y biopolímeros (Gomes y Fernandes, 2010, Rodríguez-Méndez et al. 2018). Con esta finalidad, se han utilizado numerosos tipos de aleaciones, andamiajes minerales, matriz ósea desmineralizada, hidrogeles, etc. (Liu et al. 2023).

Para el tratamiento de defectos óseos, enfermedad periodontal y otras enfermedades de los huesos maxilofaciales, se han utilizado implantes de los que, como ya hemos mencionado, los autoinjertos son los más eficaces, aunque no dejan de tener algunas desventajas. Además de los autoinjertos óseos se han utilizado aloinjertos, es decir, procedentes de otro individuo de la misma especie y xenoinjertos, procedentes de otras especies animales. Además de estos injertos óseos, se han utilizado numerosos materiales biocompatibles que evitan problemas tales como el rechazo inmunológico, infecciones etc. Uno de los grupos de biomateriales más utilizados es el fosfato de calcio, que contiene los mismos elementos químicos que el hueso. Como variedades de fosfato cálcico se distinguen, entre otros, la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico. Ya se explicó la similitud de la composición y estructura química de la hidroxiapatita con la encontrada en el hueso, por lo que este material se utiliza frecuentemente en clínica, aunque los resultados son relativamente inconsistentes.

El fosfato tricálcico se utiliza en dos fases diferentes α y β , que se diferencian en la biocompatibilidad y en la conductividad (Montero et al. 2023). Se ha observado que la biodegradación de mezclas de tipos de fosfato cálcico es mayor que la de los compuestos puros, de manera que se está utilizando mucho una mezcla de hidroxiapatita y fosfato tricálcico β . El sulfato de calcio tiene una resistencia física mayor que otros compuestos y se utiliza en combinación con fosfatos de calcio. También se ha empleado como soporte una mezcla de monetita con Zn, fosfato cálcico amorfo, hidroxiapatita y gel de sílice, que mostró mayor regeneración ósea en cráneo de conejos que el hueso

bovino anorgánico y que el fosfato tricálcico β (Benito-Garzón et al. 2021). Asimismo, también se han ensayado como soportes compuestos de colágeno e hidroxiapatita empleando nanotecnología (Sri et al. 2023) y andamiajes de ácido hialurónico y folatos Sr/Zn en la formación de tejido osteocondral (Asensio et al. 2021).

Entre otros soportes propuestos para la regeneración del tejido óseo se hallan la espuma de poliuretano porosa, materiales plásticos y cerámica porosa con propiedades similares. También se han construido andamiajes mediante bioimpresión tridimensional con materiales como el ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) o biotintas de colágeno. El módulo de compresión obtenido con PLGA es similar o incluso mejor que el del hueso trabecular de la mandíbula y su degradación hidrolítica es relativamente baja (Karanth et al. 2023), si bien las células similares a osteoblastos necesitan de una cobertura de fibrinógeno para anclarse bien al andamiaje y proliferar. Las células similares a osteoclastos se adhieren bien y se diferencian y proliferan en los andamiajes.

También han dado buenos resultados los andamiajes de fibrina-agarosa y membranas de colágeno en la regeneración ósea (García-Honduvilla et al. 2018; Martín-Piedra et al. 2021; De León-Oliva et al. 2023), reportándose incrementos de la osteocalcina, del receptor de calcitonina, catepsina K, RANKL y BMP2, a la vez que elevación de factores de reclutamiento celular como el receptor de quimioquina tipo 4 (CXCR4) que atrae a células mesenquimales y el quimiotáctico de monocitos proteína 1 (MCP-1) que recluta osteoclastos (Turri et al. 2016). Por su parte, también han dado buenos resultados membranas no reabsorbibles como las fabricadas con politetrafluoroetileno (PTFE), que incrementan las células osteoprogenitoras positivas a ebf-1/Runx2 y moléculas como la osteocalcina, osteopontina, fosfatasa alcalina y sialoproteína ósea (Lima et al. 2008).

También se han utilizado revestimientos, por ejemplo, de diferentes metales y aleaciones con la finalidad de incrementar la osteointegración, aunque no se ha encontrado por el momento un revestimiento que sea claramente más eficaz que otros. El cubrir la superficie de un implante con fosfato tricálcico-hidroxiapatita ejerce una influencia osteoconductiva.

En cuanto a los implantes metálicos utilizados, la mayoría son aleaciones como el acero inoxidable 316L, cromo-cobalto o diversas aleaciones de titanio (Geetha et al. 2009) como la Ti-6Al-4V (Liu et al. 2004; Rack y Qazi, 2006) por su alta biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, bajo módulo de elasticidad y alto cociente fuerza/peso (Zhao et al. 2006). Como inconvenientes de estos soportes metálicos se encuentran el desgaste y el efecto escudo de estrés debido al elevado módulo de elasticidad comparado con el hueso, además de los largos períodos requeridos para la creación de una interfaz estable con el hueso circundante, siendo de esperar que se dé un nuevo impulso a este campo con el ensayo de metamateriales que permita ir superando los inconvenientes mencionados.

Las barreras oclusivas de titanio tienen propiedades osteoconductoras (Lundgren et al. 2000). En el maxilar superior de pacientes humanos con este tipo de implantes se produce una cantidad muy importante de hueso neoformado aunque este hueso es inmaduro, incluso después de un año del implante. No obstante, este tejido osteoide permite la sujeción de tornillos que sirven de apoyo al implante de piezas dentarias.

El titanio, por su elevada biocompatibilidad, ha sido y es muy utilizado en estomatología, donde se han conseguido notables éxitos con diversas formas de este metal. Generalmente los implantes tienen una superficie rugosa o se hallan recubiertos de alguna sustancia como la hidroxiapatita, el PRGF (plasma rico en factores de crecimiento), curcumina, vitamina K o PLGA, que aumentan la

osteointegración del implante (Anitua et al. 2009; Kim et al. 2019; Sarkar y Bose, 2020), así como recubrimiento de biocerámica (Yu et al. 2020).

La cubierta superficial con hidroxiapatita tiene más efecto que el aumento de la rugosidad o de la corrosión superficial con ácido. Otros autores han redundado en que las láminas de titanio poseen propiedades mecánicas y osteogénicas superiores (Kehara et al. 2015; Sagheb et al. 2017; Rakhmartia et al. 2019).

Para obtener la osteointegración de un biomaterial es necesaria la adhesión de las células del tejido óseo al sustrato. Esta adhesión depende fundamentalmente de la matriz extracelular que producen las células. Así, cuando se comparan la proliferación celular o la diferenciación de las células con diferentes superficies de biomateriales, como, por ejemplo, hidroxiapatita, aleación cromo-cobalto, molibdeno o titanio, los resultados son muy diferentes. Por el contrario, los estudios de microscopía electrónica han mostrado que la ultraestructura de la interfase hueso-implante de los implantes hechos con titanio puro, aleación titanio-aluminio-vanadio, aleación cromo-cobalto y acero inoxidable es similar en todos ellos. La formación de hueso nuevo, adyacente al material implantado, puede ser clasificado como osteogénesis a distancia, osteogénesis de contacto u osteogénesis de unión. Los principales constituyentes de la matriz extracelular producida sobre hidroxiapatita y titanio fueron fibronectina, laminina, y colágeno II y III.

La geometría de la superficie influye decisivamente en la osteointegración, por lo que se han estudiado numerosos métodos de crear poros, rugosidades, surcos etc. que faciliten la unión celular al implante.

También se han utilizado espumas de titanio que, por su estructura física, se asemejan a la estructura del hueso y permiten el crecimiento de células óseas en su interior.

Los poros y las interconexiones deben ser mayores de 100 μm para un adecuado crecimiento y vascularización del implante. En los implantes en los que se han creado poros de distinto diámetro para favorecer la osteointegración parece ser que el rango óptimo del diámetro de poro oscila entre 100 a 400 μm , y entre 1 y 600 μm en el caso de fosfato tricálcico (Blanco et al. 2018). Una estructura porosa de implante de titanio transmite el estrés al tejido óseo de alrededor e incrementa la estimulación mecánica del hueso (Liu et al. 2019).

Una osteointegración similar a la de titanio ha sido obtenida con implantes de zirconio con superficies modificadas (Kubasiewicz-Ross et al. 2018)

3. Factores

Diferentes factores solubles se han mostrado favorecedores de la regeneración. Entre ellos se encuentra el factor de crecimiento endotelial vascular recombinante humano (rhVEGF), que depositado sobre la superficie de hidroxiapatita/coralina, promueve la angiogénesis en los estadios tempranos de la curación de un defecto de tamaño crítico en mandíbula de perro o la osteostatina sobre cerámica (Trejo et al. 2010).

Utilizando el mismo factor de crecimiento endotelial vascular, (int.5 Schliephake et al. (2012) observaron que este factor anclado sobre la superficie físicamente modificada de láminas de titanio favorecía la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana, estableciendo también que el efecto angiogénico se ejerce tanto a través de la porción fija como de la porción liberada de este factor de crecimiento.

El ácido retinoico (AR) es uno de los factores más utilizados para inducir experimentalmente la diferenciación de los tejidos embrionarios. Este derivado

de la vitamina A incrementa la diferenciación de los osteoblastos primarios *in vitro* promoviendo la expresión de genes osteogénicos y el depósito de sales minerales sobre la matriz ósea (Song et al. 2005).

Las **Proteínas Morfogenéticas Óseas** (BMPs) constituyen un capítulo destacado dentro de este epígrafe. Son mediadores importantes en la comunicación osteoblasto-osteoclasto para el adecuado balance de la remodelación ósea (Abe et al. 2000). Además de su participación en la formación de hueso y cartílago, se ha descrito que las BMPs participan en el desarrollo embrionario de vasos sanguíneos, cerebro, hígado, corazón, pulmón, intestino, extremidades, ojo, dientes y riñón.

En vertebrados aparecen con una estructura muy conservada dentro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β excepto la BMP 1. Se han subdividido en los grupos BMP 2/4, BMP 5/6/7/8, BMP 9/10 y BMP 12/13/14 (Bordukalo-Niksic et al. 2022). Las BMPs 2,4,5,6,7 y 8 son osteogénicas, mientras que la BMP 3 parece ser inhibidora (Bahamonde et al. 2001). Tras sucesivas modificaciones de sus proteínas precursoras en el citoplasma, las BMPs son secretadas como monómeros, que mediante puentes disulfuro se dimerizan para formar la molécula activa (Bragdon et al. 2010).

Por su parte, también se han descrito efectos de las BMPs sobre los osteoclastos. Las BMP 2, 5, 6 y 7 estimulan su diferenciación, así como el RANKL, que incrementa su expresión en osteoblastos por efecto de las BMP 2,4 y 7, mientras que las BMP 4 y 7 estimulan la acción osteoclástica de resorción. A su vez, los osteoclastos segregan BMP 6 que estimulan a los osteoblastos para su acción osteogénica (Bordukalo-Niksic et al. 2022).

Las BMPs llevan a cabo interacciones con moléculas de la matriz extracelular como verse secuestradas por colágeno IV, pequeñas proteínas ricas

en leucina y fibrilinas, inhibiendo así su función (Wu et al. 2016; Sedlmeier et al. 2017) y promoviendo su acción (Umulus et al. 2009).

Las posibilidades de estas BMPs han permitido que las 2, 5 y 7 hayan sido empleadas terapéuticamente en la regeneración ósea añadidas a matrices de colágeno (White et al. 2007; Bishop y Einhorn, 2007).

Los principales inhibidores de las BMPs son la nogina y la cordina (Zimmerman et al. 1996).

La vitamina D, sobre todo administrada sistémicamente, ayuda a la regeneración ósea y osteointegración del implante. Aplicada junto a células madre y osteoblastos incrementa la osteogénesis con aumento de la expresión de genes que codifican las proteínas de la matriz ósea y la fosfatasa alcalina (Sundar et al. 2023). Por su parte, los nervios sensoriales y simpáticos interactúan con el hueso mediante sus neuropéptidos, neurotransmisores, proteínas, péptidos y derivados aminoácidos, estando la secretoneurina y la espresina implicadas en la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos, en el metabolismo óseo, en su crecimiento y remodelación (Assefa, 2023).

La BMP 2 incrementa la diferenciación osteogénica de osteoblastos primarios y de células madre competentes, así como la aposición de calcio (Cochran et al. 2004; You et al. 2019). En defectos de los huesos craneales, Cowan et al., (2005) han utilizado una combinación de AR y BMP 2 para prediferenciar CMMTA a células de estirpe osteoblástica. Estas células prediferenciadas sembradas sobre soportes de poliláctico-co-glicólico recubierto de hidroxiapatita se implantaron en defectos de huesos craneales y fueron capaces de producir de forma más rápida gran cantidad de tejido óseo a las dos semanas del implante; sin embargo, a las 4 semanas apareció una extraordinaria reacción osteoclástica produciendo importantes defectos óseos a

las ocho semanas del implante. Esta reacción osteoclástica se ha atribuido, al menos en parte, a la presencia de AR en los implantes (Saneshige et al. 1995).

Las CMMTA cultivadas en monocapa tras una exposición de solamente 15 días a AR muestran una diferenciación osteoblástica similar a exposiciones más largas (25 días) (Wan et al. 2007). La exposición corta al AR presenta la ventaja de que no aparece la reacción osteoclástica por lo que sugieren que la modulación de la exposición a AR antes del implante puede acelerar la reparación de los defectos óseos utilizando CMMTA.

Las BMPs se utilizan experimentalmente para facilitar la unión y reparar así lesiones de tamaño mayor que el tamaño crítico, si bien son pocos los estudios publicados que demuestran una acción clara de estas proteínas en el incremento de la osificación (Liao et al. 2003; Schmidmaier et al. 2009), mientras que los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), así como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina perjudican la osteointegración del implante de titanio (Haimov et al. 2017).

Wang et al. (2017), en un estudio sobre la reparación de defectos de tamaño crítico en mandíbula de conejo, incorporan partículas de ácido poliláctico co-glicólico capaces de liberar insulina. Estas partículas poseen propiedades estructurales y mecánicas que favorecen la adhesión y proliferación celular y la diferenciación osteoblástica acelerando la curación del defecto óseo. En este mismo sentido parece actuar la liberación de insulina localmente. Por su parte, el ácido zoledrónico puede prevenir la pérdida de hueso inducida por lesión próxima a un implante intramedular (Miettinen et al. 2009). Bolamperti et al. (2022) distinguen entre un remodelado óseo dirigido por factores locales y un remodelado estocástico dependiente de factores sistémicos, que cooperan para mantener la competencia mecánica a la vez que atienden las demandas metabólicas.

D. MODELOS

Un modelo experimental frecuentemente utilizado es el basado en la creación de defectos óseos de tamaño crítico en huesos de osificación membranosa, como los huesos del cráneo o los maxilares (Spicer et al. 2012; Peña González y Redondo González, 2019; Trejo-Iriarte et al. 2019). La lesión que se estudia consiste en un defecto producido por la extracción de un círculo de hueso del diámetro necesario, siendo los parámetros de estos modelos cuidadosamente establecidos por los autores, de tal manera que puede ser utilizado con diferentes métodos de reparación, con fines comparativos o para estudios relacionados, en general, con la osificación membranosa y su patología.

También se han utilizado los “defectos de tamaño crítico” en huesos de osificación endocondral, por ejemplo, en fémur de rata (Poser et al. 2014). En este modelo se lleva a cabo un defecto óseo unilateral de 5 mm de diámetro y se utiliza como modelo experimental de osteoporosis en la rata. Los resultados de la comparación de la curación del defecto óseo en ratas normales y en ratas osteoporóticas indicaron que no había diferencias significativas, siendo por lo tanto un modelo experimental de enfermedad ósea más que un método de prueba de la capacidad curativa de un tipo de implante.

Se ha utilizado un modelo de defecto mandibular de tamaño crítico en conejo para comparar la capacidad curativa de un constructo del fosfato de calcio poroso bifásico con un implante de hueso autólogo (Santos et al. 2017). Los experimentos indicaron que no había diferencias significativas entre los dos tipos de implantes, por lo que el compuesto cerámico podría ser considerado un sustituto válido del implante autólogo.

En otro modelo experimental de regeneración ósea de un defecto de tamaño crítico en el borde alveolar de las mandíbulas de perros se estudió el efecto de células madre derivadas del tejido adiposo comparando un soporte hecho con partículas de fosfato tricálcico con un soporte de fibronectina. Cada uno de estos soportes dio origen a dos grupos según se hallen recubiertos o no con células madre dejando el defecto óseo sin cubrir, como control. Los autores no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales de igual tiempo de espera tras el implante, pero se hallaron diferencias en el área de regeneración ósea cuando se comparan animales sacrificados a 1 y 3 meses (Alvira-Gonzalez et al. 2016).

En una revisión sobre el uso de modelos animales para la investigación translacional en tejido óseo, Muschler et al. (2010) comparan las 10 especies de mamíferos más utilizadas en este tipo de estudios e identifican algunas de las principales dificultades que existen para la aplicación de los resultados obtenidos en modelos experimentales a los casos clínicos. De los datos obtenidos, concluyen que es necesario renovar y reformar los modelos animales en el sentido de hacerlos más fácilmente aplicables a la clínica humana. Por su parte, Basyuni et al. (2020) realizan una revisión sistemática sobre la regeneración de defectos críticos.

Con soportes de biocerámica con hidroxiapatita en los que se sembraron células estromales de la médula ósea, se han elaborado implantes para tratar defectos óseos en pacientes humanos en los que Cancedda et al. (2003) obtuvieron resultados prometedores para el tratamiento de defectos óseos que superan el tamaño crítico. Estos autores, utilizando implantes de células estromales de la médula ósea en soportes tridimensionales en diáfisis tibial de la oveja, encontraron que en principio se formaba hueso en la superficie externa del implante, posteriormente se formaba en el canal medular, a continuación,

se formaban roturas y fisuras en el implante y formación de nuevo hueso en los poros del soporte de biocerámica.

Para reparar los defectos de la región periodontal, cemento y hueso, se ha estudiado con éxito la regeneración tisular guiada, que consiste básicamente en colocar una barrera membranosa que impide que los tejidos epitelial y conectivo gingivales penetren en el coágulo subperiodontal, impidiendo así la formación de hueso en este nivel. Una alternativa que ha tenido resultados importantes es la colocación en el diente de una barrera membranosa subperióstica que permite la transformación del coágulo submembranoso en hueso (Schmid et al. 1994), método que se denomina aumento/regeneración del tejido óseo.

Como descripción general de la reparación de una lesión en huesos de origen mesenquimático pueden considerarse los estudios de Chin et al (2013). Estos autores llevaron a cabo estudios experimentales y comparativos de la reparación de defectos óseos mandibulares de tamaño crítico (5 mm) y subcríticos (2 mm) en ratas espontáneamente hipertensas y en ratas normales. Los datos que obtuvieron no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos.

En odontología existen defectos óseos que, aunque no son de un tamaño excesivamente grande, sobrepasan el tamaño crítico, no se recuperan por sí solos y pueden causar una patología importante y progresiva tanto en la mandíbula como en el maxilar superior. Como ejemplo se pueden considerar las pérdidas de hueso alveolar tras exodoncias múltiples que producen una pérdida ósea que dificulta la posibilidad de colocar implantes dentales. Un proceso similar sucede en las personas de edad avanzada cuyos senos maxilares pueden pneumatizarse, disminuyendo en el maxilar superior la cantidad de hueso disponible. Tales defectos óseos pueden clasificarse en horizontales y verticales. Los primeros consisten en una pérdida generalizada del volumen

óseo en el plano horizontal, mientras que en los verticales la pérdida ósea no es tan voluminosa y se produce principalmente en el plano vertical (defecto en “V”).

I. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La hipótesis general bajo la que se ha realizado este estudio consiste en que el nuevo método de inclusión y corte propuesto permite una mayor versatilidad y aplicabilidad en la investigación de la regeneración ósea y que los implantes de lámina de titanio en el hueso mandibular, con las relaciones espaciales entre el titanio y el hueso, dirigen y controlan la neoformación de tejido óseo, favoreciéndose el proceso si se añaden células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (CMMTA); por lo que el conocimiento de estos procesos podría ser utilizable en acciones terapéuticas curativas o paliativas en la medicina regenerativa del hueso restaurando su integridad estructural.

Objetivos

1. Proponer un nuevo método para el estudio de tejidos duros.
2. Estudiar histológicamente dónde y cómo se forma más hueso tras la colocación de un implante de titanio en un defecto óseo mandibular.
3. Evaluar el efecto de la adición de células madre al implante.
4. Estudiar la relación histológica del tejido con el implante (B/T).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

A. SUJETOS

Hemos utilizado un total de 28 ratas albinas Wistar adultas jóvenes (150-250 g) de ambos sexos. Los animales fueron obtenidos del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. La alimentación fue “ad libitum” con pienso compuesto (SNIFF) y agua. Se mantuvieron en un ciclo luz-oscuridad de 12/12 horas y condiciones estándar de humedad. El cuidado, la cirugía y el tratamiento postquirúrgico de los animales se realizaron según las directrices comunitarias (2010/63/EU) y españolas (RD 53/2013) para el cuidado de los animales de laboratorio y de experimentación. El proyecto ha sido aprobado por el Servicio de Bienestar Animal y por el Comité de Ética de la Universidad de Valladolid.

Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de 5 animales útiles en cada grupo. Otros 4 animales fueron desechados por fallos en la cirugía y 4 murieron debido a la anestesia.

1.- Los animales de un primer grupo (Grupo A), que hemos utilizado como control positivo, fueron sometidos a una osteotomía de tamaño subcrítico (2-3 mm), sin ninguna ayuda a la regeneración ósea.

2.- A los animales del segundo grupo (Grupo B) se les practicó una osteotomía crítica de 4 mm de diámetro, constituyendo el grupo de control negativo, pues no se le implantó ningún tipo de prótesis ni se favoreció la regeneración ósea por ningún medio.

3.- A cada animal del tercer grupo (Grupo C) se le practicó una osteotomía de tamaño crítico, al igual que al grupo B, pero en este caso se cubrió con una lámina de titanio perforada.

4.- Los animales del cuarto grupo (Grupo D), además de la osteotomía de tamaño crítico obliterada con una lámina de titanio como en el grupo C, llevaron adheridas en la cara externa de la lámina un cultivo de células madre mesenquimales autólogas procedentes del tejido adiposo.

Grupo				
A Control positivo	Osteotomía subcrítica (< 4 mm)			
B Control negativo		Osteotomía crítica (4 mm)		
C Grupo Titanio		Osteotomía crítica (4 mm)	Lámina de titanio	
D Grupo Titanio+CMMTA		Osteotomía crítica (4 mm)	Lámina de titanio	Células madre mesenquimales

B. ANESTESIA

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina (Imalgene®) 0.13 mg/100g de peso y xilacina (Rompum®) 0,02 mg por cada 100 g de peso.

C. OSTEOTOMÍA

Una vez anestesiados los animales se rasuró el pelo de la zona a intervenir y se desinfectó la superficie cutánea con povidona yodada.

Se practicó una incisión de unos 5 cm paralela a la base de la mandíbula izquierda, en la rama ascendente (Fig. 4).

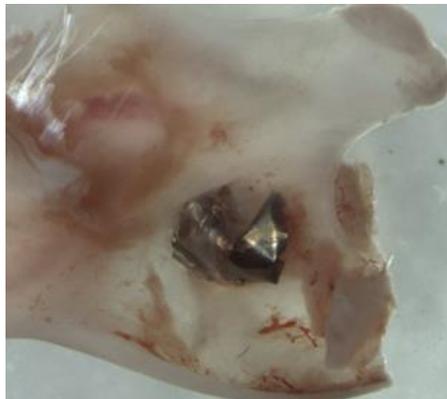


Figura 4. Osteotomía de tamaño crítico (4 mm) en el cuerpo de mandíbula de rata, con la lámina de titanio injertada.

Se separaron cuidadosamente las fibras del masetero, se desinsertaron y se despejó un área suficiente para hacer la osteotomía. Las osteotomías de 2-3 ó 4

mm, según el grupo, se realizaron con un micromotor refrigerado con solución salina y una fresa redonda de carburo de tungsteno.

Se procedió, entonces, a la colocación de una lámina de titanio en los animales de los grupos C y D (Fig. 4) y, como se ha dicho, en el grupo D sobre la lámina se habían cultivado previamente células madre mesenquimales del tejido adiposo (CMMTA).

Se cerró el plano muscular con sutura reabsorbible de 5 ceros y la piel con seda de 3 ceros. Se desinfectó la herida y se inyectaron intramuscularmente unos 6 millones de unidades de penicilina benzatina. Los animales fueron devueltos al animalario y se les suministró ibuprofeno en el agua de bebida, 5 ml por 500 ml de agua.



Figura 5. Lámina de titanio perforada que constituyó la base del implante.

D. LÁMINA DE TITANIO

La lámina de titanio, de 12,7 μm de espesor (Alfa Aesar), se perforó con una punta de una aguja de 24 G en el 50% de su superficie (Fig. 5).

Una vez perforadas las láminas, se cortaron en forma circular de unos 6 mm de diámetro y, en un molde de madera con un hueco similar al tamaño crítico, se presionaron la prótesis para que se adaptaran a la osteotomía, colocándose en ésta a continuación.

E. CULTIVO DE CÉLULAS (CMMTA)

Los animales del Grupo D, 9 días antes de la osteotomía se les tomó aproximadamente un gramo de grasa para obtener células madre mesenquimales, según el método descrito por Kuhbier et al. (2010). Este método consistió básicamente en tomar, bajo anestesia, alrededor de un gramo de tejido adiposo de la región inguinal de la rata. El tejido se disgregó mediante agitación en medio de cultivo con colagenasa (1%) y tripsina (1%). El tejido homogeneizado se pasó a través de una malla de 100 μm y se sembró en placas de cultivo primario.

Tras una hora de incubación en estufa (Hera Safe Heraeus) con temperatura de 37 °C, presión parcial de CO₂ al 5% y humedad a saturación, se lavaron los cultivos, se descartaron los sobrenadantes y se cultivaron las células adherentes. Los cultivos de células adherentes se llevaron a cabo en medio DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium, Gibco) suplementado con el 10% de suero bovino fetal y penicilina-estreptomicina al 1% (Gibco). Una vez lavado el cultivo con el medio de cultivo DMEM sin suero se troceó y se pasó por un tamiz de 100 μm de poro dos veces.

El filtrado se recogió en dos placas de 3 cm sobre cuyo fondo se había depositado una lámina de titanio de 3 cm de diámetro con medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal, antifúngicos y antibióticos. Estas placas se dejaron sedimentar durante una hora, después de lo cual se lavaron con tampón fosfato y se retiró el sobrenadante, quedando sólo las células adherentes que continuaron en cultivo. Cuando las células alcanzaron la semiconfluencia (suele ser al pase número 3 ó 4) se separaron en dos placas de 3 cm repetidas veces hasta que se implantan formando parte de la prótesis. En el momento del implante se toma la lámina de cultivo con sus células, se preforma para adaptarlo a la osteotomía y se sitúa en la osteotomía dejando la superficie con las células en cultivo en la cara externa de la mandíbula. Las células madre mesenquimales quedarían cubiertas por los planos musculares al cerrar el campo quirúrgico y dentro del defecto óseo.

Para establecer el ritmo de crecimiento y la morfología de las células mesenquimales utilizamos la fluorescencia de las células teñidas con Fluoropaque® (Gayoso, 2015) y observadas y fotografiadas con epi-iluminación en un microscopio Axiophot Zeiss equipado con una cámara digital Axiocam HRc (Fig. 6).

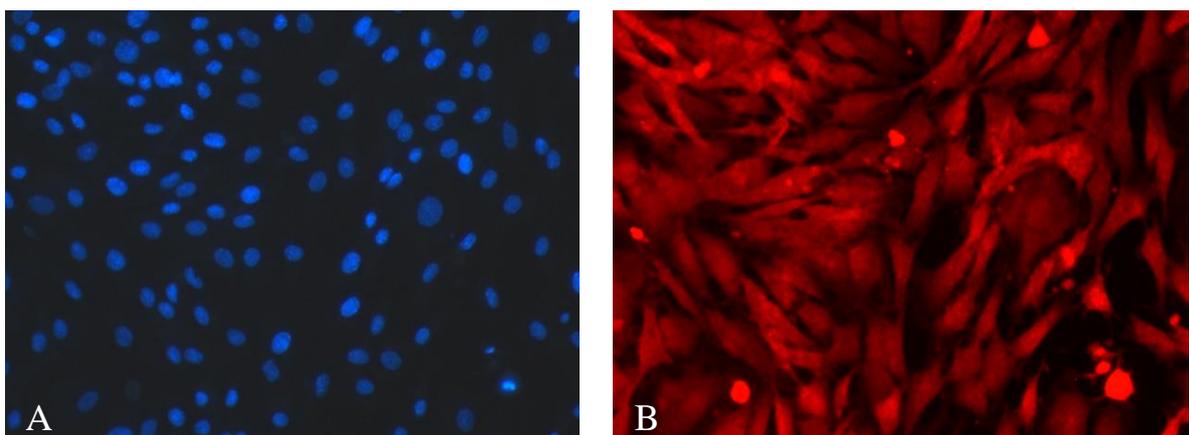


Figura 6. Cultivo de células madre mesenquimales del tejido adiposo (CMMTA) teñidas con DAPI (A) y Fluoropaque (B).

F. SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS

Después de una supervivencia de 30 días, los animales fueron perfundidos intracardialmente, bajo anestesia, primero con un bolo de solución salina (NaCl 0,9%) y heparina (0.1%). Posteriormente se perfundió el animal con fijador que fue diferente según el estudio incluyera microscopía electrónica de transmisión o no.

Los animales que fueron estudiados con microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido se fijaron con paraformaldehído al 4% tamponado quedando las hemimandíbulas en este mismo fijador toda la noche y siendo procesadas después de lavadas con tampón, sin descalcificación previa, con nuestro nuevo método denominado “de las tres secciones” (Gayoso et al. 2020) explicado más adelante.

Los animales destinados al estudio ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión fueron perfundidos con paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 1%. (Palay y Chan Palay, 1973) y se tomaron sus hemimandíbulas, que permanecieron toda la noche en el fijador para posteriormente ser incluidas enteras en epoxirresina de baja viscosidad Spurr (Spurr, 1969) (Fig. 7).



Figura 7. Hemimandíbula izquierda después de ser incluida en epoxirresina, mostrando la osteotomía con el implante de lámina de titanio.

G. MÉTODO DE LAS TRES SECCIONES

Este método consiste básicamente en tres ciclos consecutivos de inclusión en epoxirresina y corte. Cada uno de los tres diferentes ciclos produce diferentes tipos de secciones. Así, el primer ciclo produce cortes gruesos (unos 300 μm de espesor), cortes semifinos (de 1-3 μm) y cortes ultrafinos de 20-40 nm según se explica a continuación (Fig. 8).

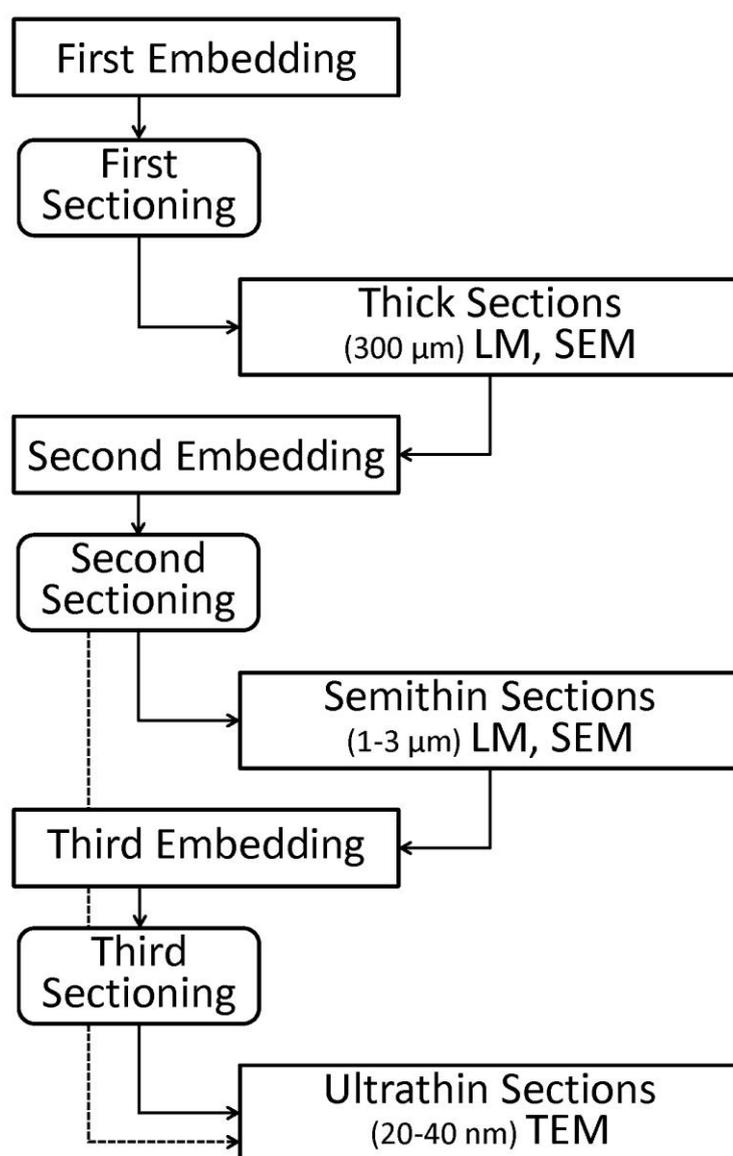


Figura 8. Esquema ilustrativo del método de las tres secciones (Gayoso et al. 2020).

1. Primera sección

Primera inclusión:

Las hemimandíbulas fueron sometidas a deshidratación con alcoholes crecientes 50°, 70°, 90° y 100°, tres pases de 15 minutos en cada concentración. A continuación, se pasaron las piezas a una mezcla a partes iguales de alcohol absoluto y óxido de propileno, tres cambios de 15 minutos. Después de esto se pasaron a óxido de propileno puro, tres cambios de 15 minutos, a continuación, las piezas se infiltraron durante la noche con una mezcla de óxido de propileno y epoxirresina de baja viscosidad (Spurr, 1969). Al día siguiente, las piezas se transfirieron a epoxirresina pura y se colocaron en la posición adecuada en un molde de material no adherente a la epoxirresina como el teflón o la silicona. Con la finalidad de mejorar la inclusión o penetración de la resina en las piezas y de extraer las burbujas de aire que puedan haberse formado, mantuvimos las piezas en sus moldes en una campana de vacío de 200 mbar durante 6 horas. La polimerización se llevó a cabo durante la noche en estufa a 60° C.

Primer corte:

Las secciones se realizaron con una sierra de precisión IsoMet™ 4000 (Buehler) con discos de polvo de diamante de 140 micrómetros de espesor. A estas secciones, de unos 300 µm de espesor y hasta 2 cm de longitud, las hemos denominado secciones gruesas. Estas secciones son adecuadas para su estudio con microscopía estereoscópica. Nosotros hemos utilizado un

estereomicroscopio Leica M80 con cámara Leica HC100 HD. Asimismo, pueden ser utilizadas para su estudio con microscopía de luz de bajos aumentos, por ejemplo, lentes objetivo de hasta 10x.

Los cortes gruesos permiten el estudio seriado y la reconstrucción tridimensional si fuera necesaria, así como la microscopía electrónica de barrido.

2. Segunda sección

Segunda inclusión:

Una vez que se han estudiado los cortes gruesos, se eligen las áreas de interés que serán reincluidas en epoxirresina. Para ello se cortarán dichas áreas de interés. Estas piezas se lavarán rápidamente con óxido de propileno, se vuelven a sumergir en nueva epoxirresina, se colocan en la posición adecuada dentro de su molde y se polimerizan durante una noche a 60 °C.

Segundo corte:

El segundo corte se realiza en un ultramicrotomo y de él se obtienen cortes semifinos (1-3 μm de grosor).

Los cortes semifinos pueden ser teñidos con diferentes tinciones histológicas tales como azul de toluidina (al 1% en 3% de tetraborato de sodio), para tinciones generales; y para tejidos calcificados hemos utilizado el método de von Kossa (Bankoff & Gamble, 2008) y el rojo de alizarina (0,2% en agua

desionizada). Estas secciones semifinas se pueden utilizar para, al menos, tres tipos de estudios (Fig. 9).

El estudio más directo es la obtención de cortes ultrafinos (20-40 nanómetros) para su estudio ultraestructural con el microscopio electrónico de transmisión, procediendo de manera análoga a la microscopía electrónica convencional. De esta forma se localiza un área de interés en los cortes semifinos y luego se suele localizar en el resto del bloque. Es en esta zona del bloque de inclusión de donde se suelen obtener los cortes ultrafinos. Los cortes ultrafinos son tratados con acetato de uranilo y citrato de plomo para aumentar el contraste.

El segundo tipo de estudio se realiza sobre secciones semifinas de las áreas seleccionadas en los bloques de epoxirresina procedentes de la segunda inclusión. En estas secciones se pueden llevar a cabo prácticamente todas las técnicas histológicas, es decir, tinciones generales, inmunohistoquímica, hibridación in situ, etc. Además, para mejorar la realización de algunas técnicas histológicas, ya que la epoxirresina es más difícil de teñir que otros medios de inclusión, se pueden utilizar métodos para recuperar la antigenicidad, como por ejemplo el etóxido sódico (Tóth & Czoma, 2011) o el tampón citrato a alta temperatura.

En tercer lugar, si algún tipo de estructura histológica se halla, por ejemplo, en unos pocos cortes semifinos, estos cortes pueden reincluirse (tercera inclusión-corte) para su estudio, obteniendo cortes ultrafinos.

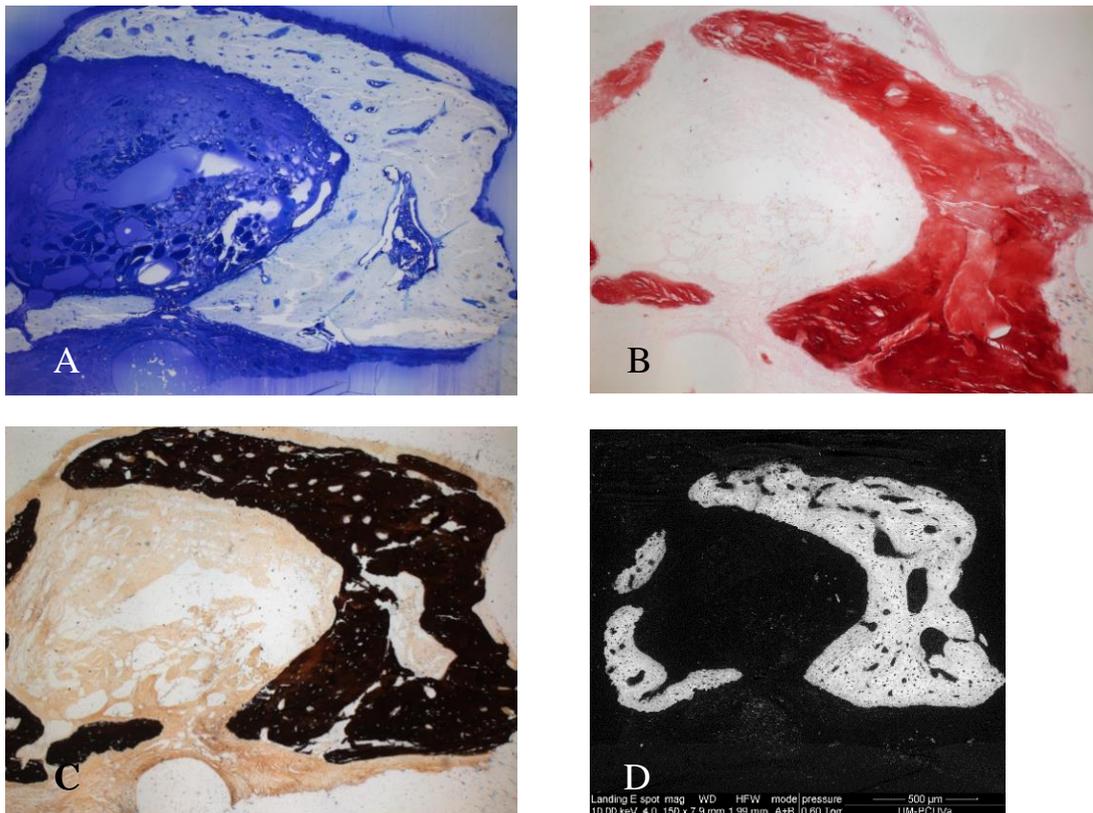


Figura 9. Secciones de mandíbula de rata a la que se le practicó una osteotomía de tamaño crítico (grupo D) observadas con diferentes técnicas, mostrando la versatilidad que permite nuestro método de las “tres secciones”. A: Azul de toluidina; B: Rojo de alizarina. C: Von Kossa; D: Microscopía electrónica de barrido. El tejido óseo aparece claro en A y D, rojo en B y negro en C.

3. Tercera sección

Tercera inclusión:

Como hemos indicado anteriormente, un corte semifino o parte de él puede ser nuevamente reincluido en epoxirresina para obtener cortes ultrafinos de un área determinada. En este caso el énfasis ha de ponerse en polimerizar el área

de interés incluida otra vez en epoxirresina, sobre una superficie plana, como puede ser una pieza de resina polimerizada y cortada con el ultramicrotomo.

Tercer corte:

La pequeña muestra del corte semifino vuelta a reincluir puede ser cortada en un ultramicrotomo para su estudio ultraestructural. Con la metodología de la microscopía electrónica convencional.

La microscopía electrónica de barrido ha sido llevada a cabo en un microscopio electrónico de barrido SEM (QUANTA 200 FEG) operando en modo de bajo vacío en el rango de 0,6 a 0,9 Torr. Este sistema permite obtener directamente imágenes parecidas a las de las muestras metalizadas. Nuestro SEM está equipado con detector para electrones secundarios, electrones retrodispersados y energía dispersiva de rayos X, lo que nos permite el análisis de elementos de una zona específica.

I. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

AZUL DE TOLUIDINA

1- Desparafinar: Xilol, 3 x 5 min

2- Hidratar: Alcoholes, 100° 2 x 5 min

96° 2 x 5 min

70° 2 x 5 min

Agua destilada

3- Azul de Toluidina al 1% en Tetraborato sódico al 3% durante 5 minutos a temperatura ambiente

4- Lavar en H₂O destilada durante 2 minutos (2x2 min).

5- Diferenciar con alcohol de 70° durante 2 minutos.

6- Diferenciar y deshidratar en alcohol de 96° (2 x 2 min).

7- Deshidratar con alcohol de 100° (2 x 2 min).

8- Aclarar y montar

NOTA: Filtrar el azul de toluidina antes de utilizarlo. Los tiempos varían según el tejido y el grosor del corte.

ROJO DE ALIZARINA

1- Desparafinar: Xilol, 3 x 5 min

2- Hidratar: Alcoholes, 100° 2 x 5 min

96° 2 x 5 min

70° 2 x 5 min

Agua destilada

3- Incubar con rojo Alizarina durante 1-5 minutos controlando al microscopio. (3 min)

4- Lavar en H₂O destilada (5-6 lavados)

5- Secar y deshidratar con acetona durante 30 segundos.

6- Aclarar en acetona-xileno 1:1 durante 15 segundos.

7- Aclarar en xileno y montar.

NOTA: Dependiendo del tejido se cambian los tiempos del colorante y de la diferenciación. Se puede contrateñir con verde luz 1 % durante 1 minuto entre el paso 4 y 5. Después lavar otra vez con H₂O destilada.

Rojo Alizarina S: Alizarina 2 g

H₂O des. 100 ml

Ajustar el pH con hidróxido amónico al 1% hasta 4,3.

La solución debe adquirir un color rojo vinoso intenso.

Permanece estable durante meses.

Resultados: Los depósitos de calcio aparecen de color naranja-rojizo.

VON KOSSA

Se basa en la sustitución de los iones de Ca^{2+} intratisulares por iones de plata en solución acuosa, sometidos a un proceso simultáneo de exposición a la luz solar. La exposición a la luz solar puede ser sustituida por una incubación por una solución de Ag en la oscuridad, para realizar después una reducción externa con un agente químico apareciendo unos depósitos negros donde hubo Calcio.

1- Desparafinar: Xilol, 3 x 5 min

2- Hidratar: Alcoholes, 100° 2 x 5 min

96° 2 x 5 min

70° 2 x 5 min

Agua destilada

3- Incubar con Nitrato de plata al 5% 30-60 minutos a plena luz, ó 10-60 min (10 min) en la oscuridad.

4- Lavar en H_2O destilada

5- Revelado con ácido pirogálico al 2% durante 2 minutos en la oscuridad

6- Fijación en Tiosulfato sódico al 5% durante 3-5 minutos

7- Lavar en H_2O destilada

8- Coloración de fondo con Rojo neutro al 1% durante 1-5 minutos

9- Lavar en H_2O destilada

10- Deshidratar, aclarar y montar.

NOTA: Si se incuba a plena luz el paso 5 no se hace

Resultado: El hueso aparece teñido de negro intenso

FLUOROPAQUE (Gayoso, 2012)

- 1-Desparafinar: Xilol, 3 x 5 min
- 2- Hidratar: Alcoholes, 100° 2 x 5 min
96° 2 x 5 min
70° 2 x 5 min
Agua destilada
- 3- Lavar en PBS x3
- 4- Teñir con la solución colorante 10 min
- 5- Lavar en PBS x3
- 6- Diferenciar en Alcohol de 70°
- 7- Deshidratar, aclarar en xylol y montar

<u>Solución Colorante:</u>	Eosina Y	0,1 g
	DAPI	1 mg
	Lisina	2,5 mg
	Glicina	2,5 mg
	H ₂ O dest	950 mL
	Metanol	50 mL

Esta solución necesita madurar durante 1 semana y dura, almacenada en la oscuridad, alrededor de 6 meses

III. RESULTADOS

Ya que, debido a la pequeñez de la mandíbula, no es posible utilizar directamente métodos de fijación de la prótesis al hueso, la estabilización de la prótesis depende de los tejidos que la sujetan al cerrar la incisión quirúrgica por planos. De este modo, la forma de la prótesis se hace irregular debido a los numerosos factores que ejercen influencia sobre ella, principalmente las fibras y células del tejido conjuntivo, las células musculares e incluso el propio crecimiento óseo. Las formas y disposiciones en que queda el implante con relación al hueso osteotomizado se muestran en la figura 10.

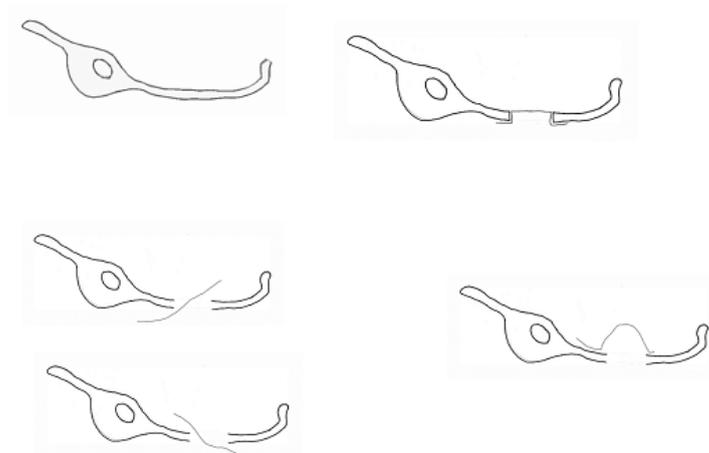


Figura 10. Posiciones en que queda la prótesis de titanio tras 30 días de su implante con relación al defecto óseo practicado en el hueso mandibular de rata. Sección frontal.

Las pruebas que hemos realizado con osteotomías mandibulares de diámetro por debajo del tamaño crítico, es decir, agujeros de 2 y 3 mm, se cierran, en general, espontáneamente sin que sea necesario ninguna prótesis y no los hemos incluido en la cuantificación de nuestro estudio. Sin embargo, los animales con lesiones de tamaño crítico o mayores (4 mm o más) no se curan

espontáneamente, sino que necesitan un apoyo, es decir, un implante para poder obliterar la lesión.

➤ **GRUPO A**

Animales de Control Positivo (Osteotomía de Tamaño Subcrítico)

En este grupo de animales, al que se le realizó una osteotomía de tamaño subcrítico y no recibió ningún tipo de implante ni tratamiento, la osteotomía apareció cerrada al final de los 30 días que abarcaba el experimento.

➤ **GRUPO B**

Animales de Control Negativo (Osteotomía de Tamaño Crítico SIN implante NI células madre)

La osteotomía de estos animales no se cerró espontáneamente o lo hizo parcialmente (Fig. 11) en el periodo de tiempo establecido para nuestro estudio (30 días). De esta forma, se suele apreciar una pequeña protrusión de tejido, aparentemente osteoide, que crece desde los bordes hacia el interior del defecto óseo sin alcanzar más de 0,5 mm. En nuestros experimentos no hemos apreciado efectos sobre el hueso mandibular próximo. Los elementos histológicos que se hallan en la zona lesionada interactúan para repararla e incluso formar hueso nuevo, aunque, si lo forma, lo hace en pequeñas cantidades.

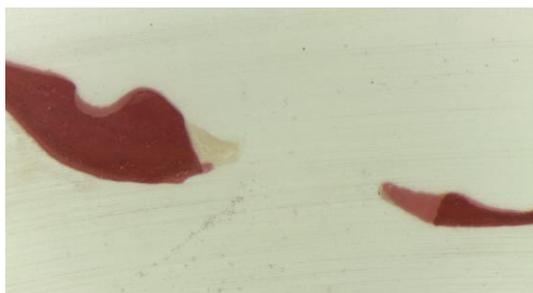


Figura 11. Sección frontal de la mandíbula de un animal del grupo B (grupo control negativo) en la que se aprecia que la osteotomía apenas se ve reducida. Creciendo desde ambos bordes hacia el interior puede observarse un ligero incremento de tejido osteoide, más pálido que el resto del hueso. Rojo de alizarina. x40.

➤ GRUPO C

(Osteotomía de tamaño crítico con Lámina de Titanio)

En nuestros experimentos, tras treinta días de supervivencia desde el implante, se genera una notable variedad de relaciones de titanio-hueso y su posible evolución, observándose, en general, una oclusión del defecto óseo realizado quirúrgicamente por un material en ocasiones compuesto por escaso tejido aún inmaduro y en otras con mayor cantidad de tejido neoformado. La osteotomía, pues, se encuentra ocupada por la placa de titanio y masas óseas que penetran en el orificio (Fig. 12A).

La neoformación de hueso produce un tejido con características histológicas diferentes del hueso preexistente. Con la tinción de rojo de alizarina se puede distinguir un hueso densamente teñido de rojo con una estructura bastante compacta correspondiente al hueso previo, normal, de la mandíbula de la rata. Alrededor de la lámina de titanio se constituye una masa de tejido óseo neoformado teñido de color más claro por la alizarina, con regiones más o menos grandes de hueso fuertemente teñido y con huecos en su

interior (Fig. 12B). Estos huecos son los espacios intertrabeculares del tejido óseo formado después de la operación quirúrgica. En esta región, en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, se puede distinguir el tejido conjuntivo que va dando origen a osteoblastos, que forman matriz ósea, y a osteoclastos, que van labrando las cavidades intertrabeculares, donde puede apreciarse la existencia de elementos de la médula ósea (Fig. 12C-E).

La región central, donde se halla el implante, es la que presenta una mayor regeneración. En la cara interna de la lámina de titanio se observa, en general, una capa de tejido fuertemente teñido con alizarina mientras que la región superficial es menos densa con esta tinción (Fig. 12B). En cortes semifinos de esta misma zona se distingue una típica estructura con osteocitos rodeados de matriz ósea (Fig. 12C y D). En la cara externa se halla con frecuencia un acúmulo de tejido neoforado, pudiéndose distinguir tanto osteoblastos como osteoclastos con su ribete en cepillo, denotando su actividad osteoclástica en pro de la remodelación ósea (Fig. 12E).

Sobre la lámina de titanio se produce una osteogénesis irregular, sobre todo en la zona posterior, más cerca del germen dentario. Cuando estudiamos las secciones semifinas teñidas con azul de toluidina, podemos observar que las áreas teñidas débilmente con alizarina aparecen fuertemente teñidas con el azul de toluidina, mientras que las cavidades intertrabeculares aparecen claras con los dos métodos. El hueso recién formado se tiñe de azul de toluidina, mientras que el osteoide está poco teñido, de modo que con el azul de toluidina se obtiene una imagen opuesta a la obtenida con la alizarina. En el hueso antiguo los osteocitos en sus lagunas óseas son de pequeño tamaño y se hallan relativamente dispersos, mientras que lo contrario sucede en el hueso neoforado. Con una organización relativamente desordenada de las trabéculas óseas neoforadas, en las demás zonas del implante puede observarse cómo se integra el titanio con el hueso adyacente. Esta integración

es variable, de tal manera que puede unirse el titanio al hueso recién formado y totalmente mineralizado, o bien hacerlo mediante hueso poco mineralizado o mediante osteoide, que tenderá con el tiempo a mineralizarse más densamente.

La zona cercana al germen dentario, como decíamos, es la que ofrece mayor proliferación, sobre todo en el lado más externo donde, aparentemente al menos, es mayor la fuerza inductiva del titanio sumado a la hiperactividad proliferativa del germen dentario observada en los roedores.

En las zonas del hueso mandibular más alejadas de ese germen dentario también se distingue osteoide, que puede haber sido inducido, en este caso, sólo por el titanio o por el tejido óseo a través de las perforaciones de la lámina de titanio o, más difícilmente, por el hueso relativamente lejano del extremo del defecto crítico.

En ninguno de los animales de este grupo hemos hallado células de tejido adiposo ni células musculares.

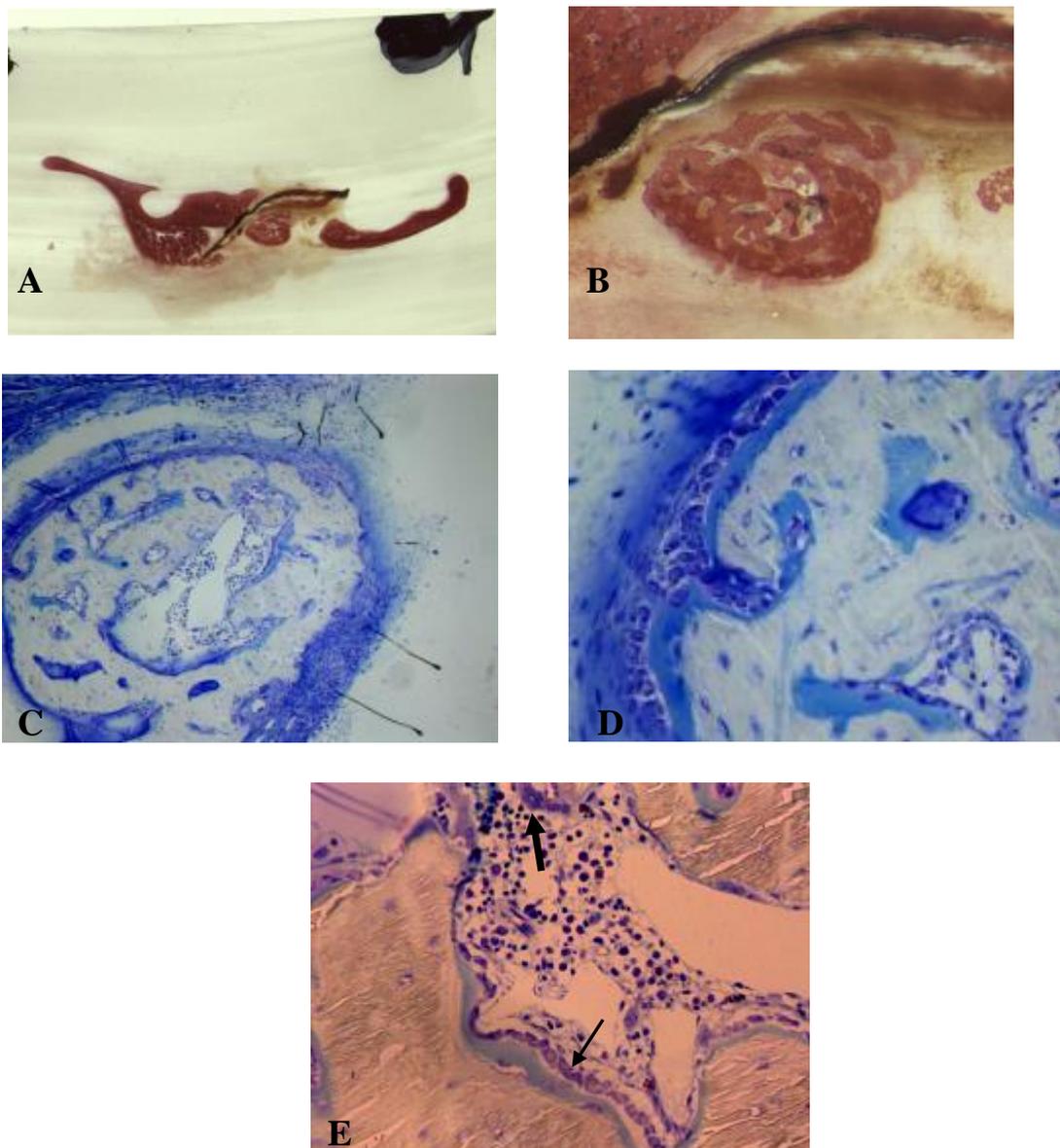


Figura. 12. A: Sección frontal de la mandíbula de un animal del grupo C a bajo aumento en el que se aprecia la oclusión del defecto crítico teñido con rojo de alizarina. B: A mayor aumento la zona central de A, en la cual la lámina de titanio aparece en negro corriendo de izquierda a derecha en curva y el hueso neoformado ocluyendo la osteotomía practicada. C: Hueso neoformado relleno del espacio de la osteotomía teñido con azul de toluidina. D: Detalle de C. E: Zona de remodelación en el hueso neoformado teñida con azul de toluidina en la que, en los límites con la médula ósea, se aprecia una hilera de osteoblastos (flecha fina) originando osteoide, y osteoclastos (flecha gruesa) en la zona de resorción ósea.

➤ GRUPO D

(Implante de Lámina de Titanio CON CMMTA)

Para la descripción de este grupo distinguiremos 5 áreas que contienen distintos elementos, pues las interacciones del implante con el hueso dan lugar a diferentes posibilidades de regeneración ósea (Fig. 13).

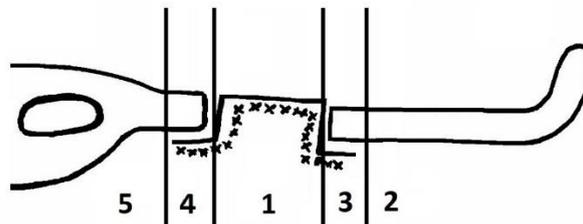


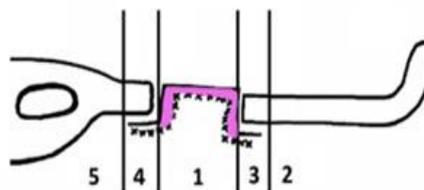
Figura 13. Esquema de las relaciones del implante y las células madre (x) con la osteotomía, enumerándose las diferentes zonas que hemos distinguido para su descripción sobre una sección frontal de la mandíbula de rata en el nivel de la osteotomía.

En este grupo de animales, se observa en general, una oclusión total del defecto óseo realizado quirúrgicamente. La obstrucción del espacio creado puede hacerse básicamente por el titanio o por el titanio y los tejidos neoformados (hueso, tejido conjuntivo). A los 30 días del implante pueden observarse masas óseas que obliteran áreas más o menos extensas del defecto.

En las 5 áreas que hemos dividido la observación de las piezas en estos animales se observa que contienen elementos diferentes. Estos elementos, al interactuar entre sí, dan lugar a diferentes posibilidades de regeneración ósea.

1. Área D1

Corresponde a la zona central de la osteotomía tapada por la prótesis de titanio con células cultivadas. Por lo tanto, estaría formada de dentro a fuera por:



1. Lámina de titanio.
2. Células madre.

En la cara externa del implante, donde se hallaban las células madre al insertarse la prótesis, se aprecia, generalmente, un crecimiento celular importante. En estos animales se observa un crecimiento y diferenciación de tejido óseo, claramente distinguible por su tinción con alizarina (Fig. 9B) y con la plata del método de von Kossa (Fig. 9C). En contraste, en secciones semifinas, de 1-2 μm de espesor, teñidas con azul de toluidina, el hueso aparece muy poco teñido (Fig. 9A). De esta forma, esta última tinción, como ya se ha dicho, produce imágenes que tienen la apariencia de una tinción negativa o inversa a las dos tinciones anteriores.

Frecuentemente, las prótesis muestran, en las secciones frontales, una forma ovoide más o menos alta, variando desde una disposición plana a otra en forma de cúpula, forma que es debida a que la lámina de titanio ha sufrido una deformación considerable. Bajo la cúpula de titanio se puede apreciar la casi total obliteración del defecto óseo, llegando a unirse los bordes (Fig. 14A). En el hueso no descalcificado se distinguen claramente, con microscopía

electrónica de barrido, su estructura histológica característica: los canales de Havers con sus vasos sanguíneos y los osteocitos con los conductos calcóforos que irradian de las lagunas óseas u osteoplasmas (Fig. 14B).

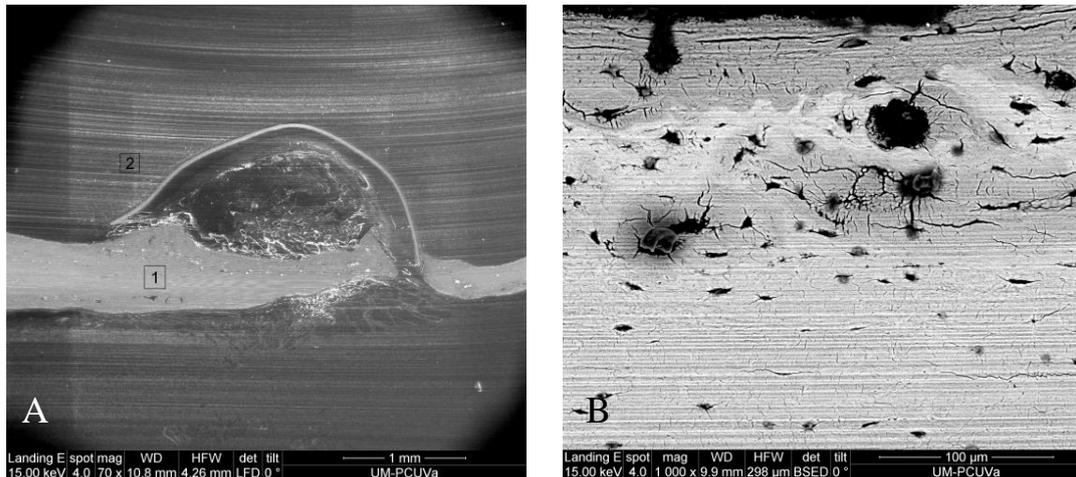


Figura 14. Microscopía electrónica de barrido de la mandíbula de un animal del grupo D, observándose en A la lámina de titanio adoptando una forma de cúpula y la estructura del tejido óseo neoformado (1) de tipo laminar ha llegado a obliterar el defecto óseo, con osteonas y osteocitos en sus osteoplasmas (B).

El análisis de elementos mediante la energía dispersiva de rayos X (EDAX) muestra, en la zona fuera del hueso, sobre todo carbono con pequeñas cantidades de oxígeno y cloro, composición química esperada para la de la resina de inclusión (Fig. 15A), en tanto que en el hueso se aprecian picos de fósforo y calcio (Fig. 15B), en una composición porcentual correspondiente a la hidroxiapatita.

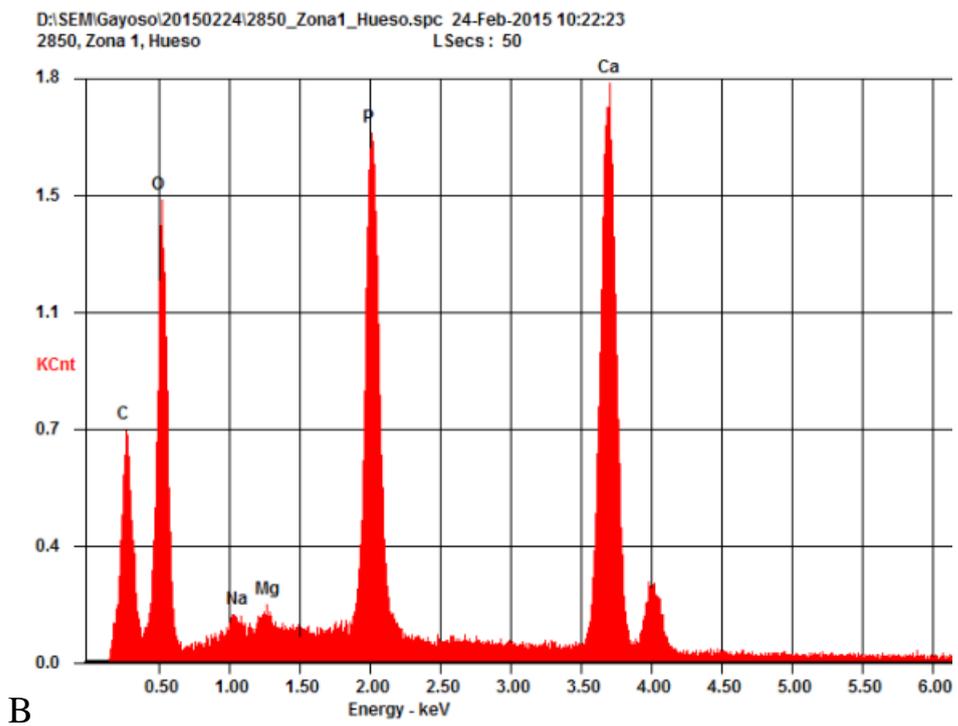
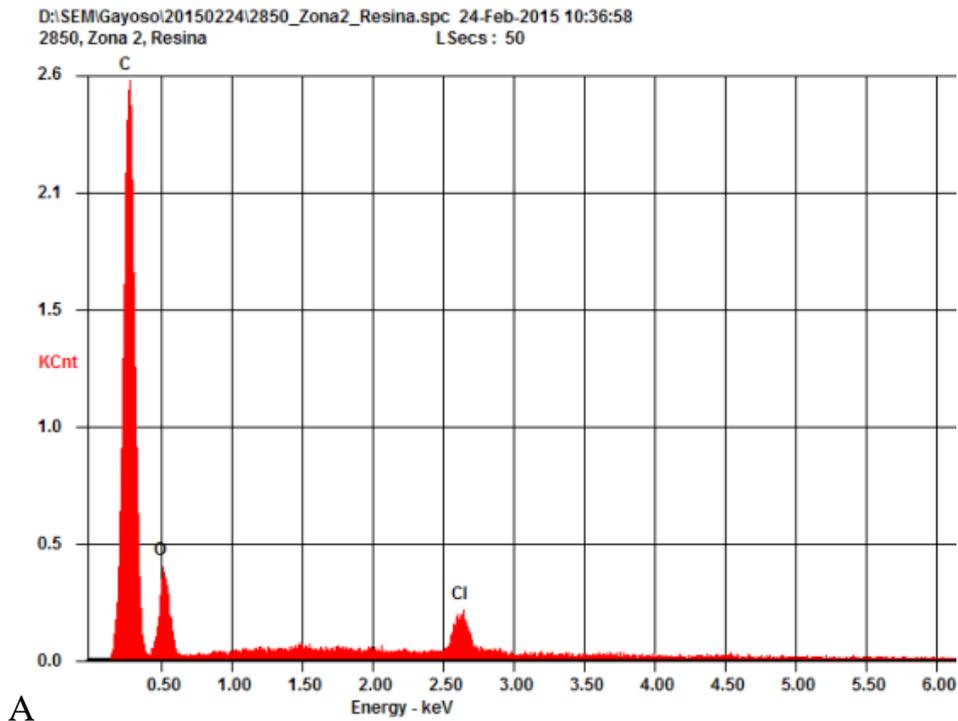


Figura 15. Microanálisis mediante energía dispersiva por rayos X (EDAX) de la zona de resina de inclusión (A) y del hueso neoforado (B). Puede comprobarse que la composición elemental del hueso se corresponde con la hidroxiapatita.

Esta área D1 es heterogénea, mostrando algunas diferencias entre animales del mismo grupo. Además, en algunos animales se produce un tejido conjuntivo muy celular cuyas capas más superficiales se diferencian a osteoblastos y posteriormente a osteocitos. La matriz ósea aparece con la tinción de azul de toluidina prácticamente sin teñir, mientras que canales de Havers, lagunas óseas y conductos calcóforos se tiñen fuertemente de azul (Fig. 16A). Los osteoblastos se muestran aplanados para posteriormente incrementar su citoplasma y producir osteoide que, tras su calcificación, conducirá a la transformación de los osteoblastos en células menos aplanadas dando origen posteriormente a osteocitos (Fig. 16B). La mayor proliferación de hueso que hemos obtenido alcanza una longitud de unos 4 mm y anchura de unos 3 mm. Esta mayor proliferación la hemos observado en la cara externa del hueso mandibular (Fig. 17).

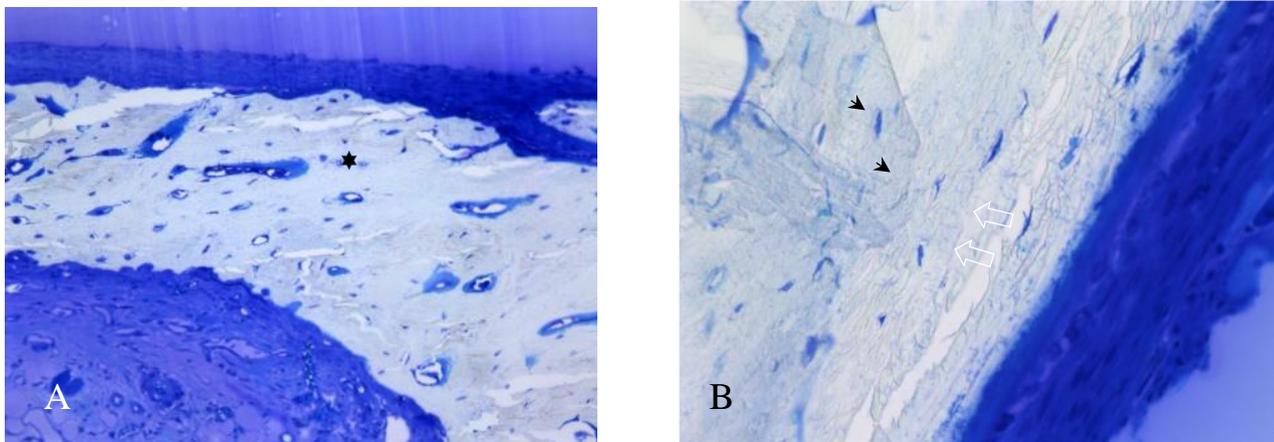


Figura 16. Región D1 de un animal del grupo D en la que se aprecia la palidez de la matriz ósea (asterisco) contrastando con la fuerte tinción de osteoblastos (flechas huecas) y osteocitos (puntas de flecha) en el tejido conjuntivo osteogénico. x150 (A) y x500 (B)



Figura 17. Regeneración ósea en un animal del grupo D. Obsérvese cómo el tejido óseo neoformado se extiende prácticamente hasta los dos extremos de la osteotomía practicada, con una intensidad comparable a la del hueso preexistente situado en ambos extremos. Rojo de alizarina. x60

En algunos implantes, además de tejido conjuntivo y tejido óseo, se diferencian otros tejidos de estirpe mesenquimal, como son el tejido adiposo y células musculares estriadas esqueléticas y, en algunas regiones del hueso neoformado se desarrolla médula ósea aparentemente normal (Fig. 18).

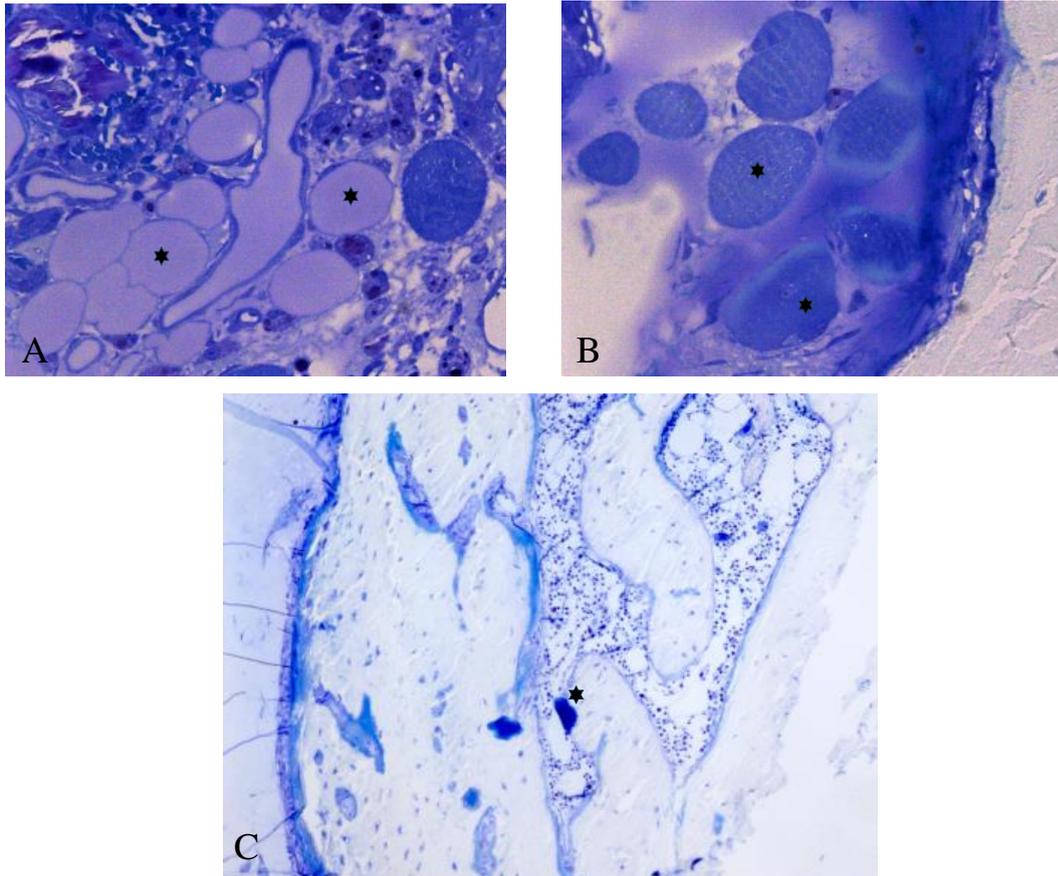


Figura 18. Células neoformadas en la región D1 del implante de un animal del grupo D originadas por diferenciación de las células madre mesenquimales implantadas, que han dado lugar, según señalan los asteriscos, a adipocitos (A), miocitos esqueléticos (B) y tejido hematopoyético (C). Azul de toluidina. x1.000 (A y B). x150 (C).

Con microscopía electrónica de barrido de presión atmosférica ambiental observamos cómo el hueso se distingue de la lámina de titanio por tener una menor densidad electrónica y una estructura histológica característica. La composición atómica del hueso regenerado es similar a la obtenida en todas las zonas del hueso ya sea preexistente o neoformado. A pesar de esta similitud en la composición química, el hueso neoformado aparece estructuralmente distinto. Con microscopía electrónica de barrido se aprecian muchos más huecos y canales vasculares en el hueso neoformado que el hueso preexistente, el cual tiene un aspecto de hueso laminar (Fig. 19). En algunas ocasiones el hueso esponjoso neoformado parece hacerse más compacto cuanto más cercano

se halla al hueso antiguo. La carencia de fijación de la lámina de titanio al hueso hace que la lámina de titanio aparezca frecuentemente separada de la lesión ósea.

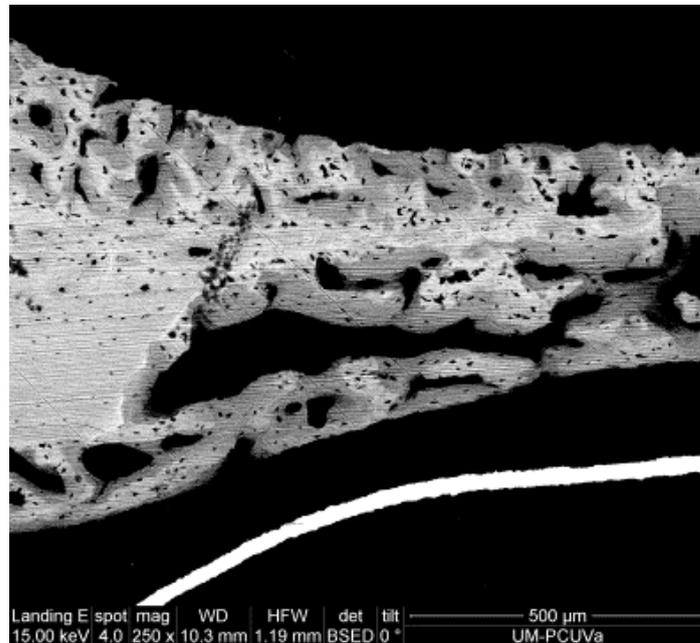


Figura 19. Microscopía electrónica de barrido de la zona D1 de un animal del grupo D en la que la lámina de titanio aparece como una línea blanca en la parte inferior, en tanto que, superiormente, en la zona izquierda aparece hueso preexistente y a la derecha hueso neoformado, de aspecto esponjoso.

2. Área D2

Es la zona más anterior adonde no llega la lámina de titanio.

Los elementos del área, de dentro a fuera, son:

1. Hueso no estimulado.
2. Hueso estimulado.



Es la zona menos reactiva, de tal forma que la proliferación ósea prácticamente no existe, siendo la estructura del hueso la característica del preexistente, una masa de tejido óseo compacto con pequeños osteocitos y abundante sustancia intercelular calcificada rodeada por periostio (Fig. 20).

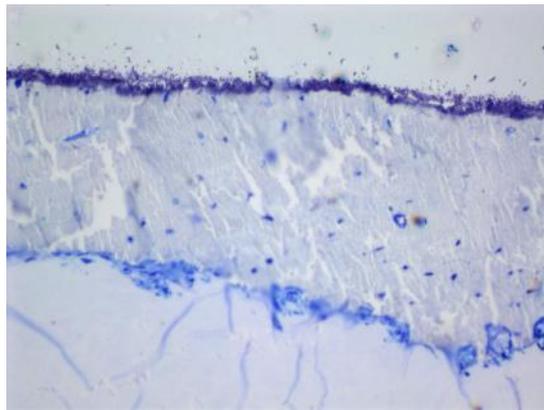
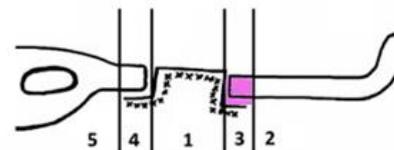


Figura 20. Región D2 de un animal del grupo D en la que se aprecia la típica estructura de tejido óseo compacto del hueso preexistente, sin existir apenas proliferación. Azul de toluidina. x150.

El que en esta región D2 de los animales del grupo D la proliferación ósea prácticamente no exista es coherente con los elementos que la constituyen: hueso no estimulado y hueso estimulado

3. Área D3

Es continuación del área D2 en dirección posterior, donde se encuentra la lámina de titanio como el límite rostral o anterior. Se compone de los siguientes elementos:



1. Hueso no estimulado.
2. Borde anterior de la osteotomía.
3. Hueso estimulado.
4. Lámina de titanio.
5. Células madre.

Esta área muestra una imagen variable en los diferentes animales de este grupo de manera que algunos muestran una muy escasa proliferación ósea dirigida principalmente hacia el interior del defecto óseo, mientras que en otros se aprecia una considerable regeneración (Fig. 21). Con la tinción de alizarina se distingue la existencia tanto del hueso denso como de una sustancia menos teñida que podría ser osteoide.

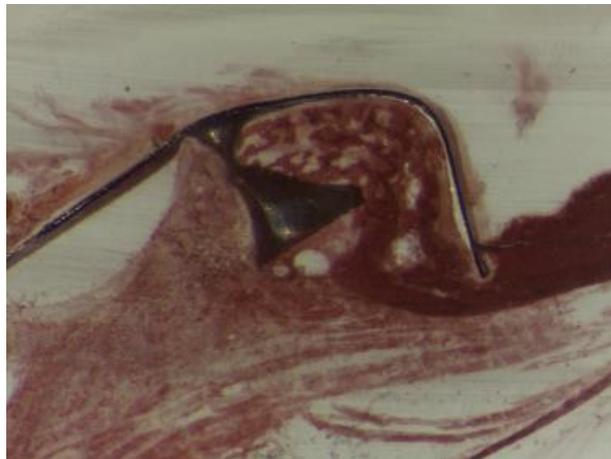
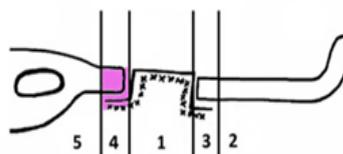


Figura 21. Región D3 de un animal del grupo D en la que se aprecia una considerable regeneración ósea con aspecto de hueso esponjoso bajo la lámina de titanio (en negro) en la zona central, y más a la izquierda, osteoide. Rojo de alizarina. x80.

4. Área D4

Es la zona posterior cubierta por la prótesis, con las células cultivadas. Los elementos del área D4, de dentro a fuera, son:



1. Hueso no estimulado.
2. Borde posterior de la osteotomía.
3. Hueso estimulado.
4. Lámina de titanio.
5. Células madre.

Al igual que el límite del área 3 está definido por la lámina de titanio en dirección inferior, hemos considerado que el límite de la lámina de titanio superiormente define el área 4. En esta región se pueden distinguir dos zonas diferentes: la región de la osteotomía que limita con el área 1 y el resto. En esta región D4 el hueso se ve estimulado para su regeneración exclusivamente en su cara externa, pues la cara interna carece de contacto con el titanio o células madre.

En esta zona D4 la osteotomía limita dos zonas con una actividad de generación ósea que puede ser importante o escasa según los animales, de tal manera que la tinción con alizarina revela regiones de hueso neoformado en la zona caudal de la lámina de titanio en unos animales (Fig. 22), mientras que en otros la mayor cantidad de hueso neoformado, y más densamente calcificado se halla al otro lado de la lámina de titanio, hacia la zona D1.

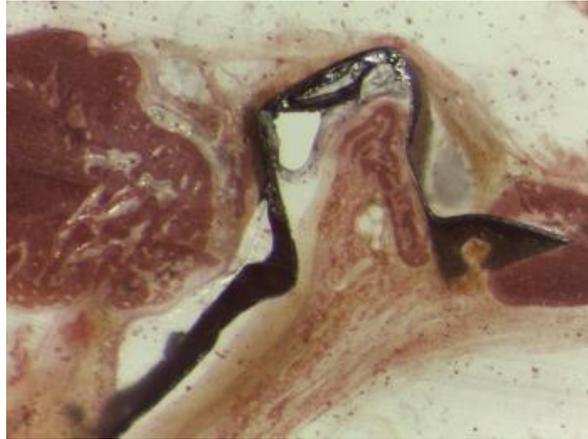


Figura 22. Región D4 de un animal del grupo D mostrando la regeneración ósea producida en su zona caudal, que desplaza la lámina de titanio (en negro). Rojo de alizarina. x80.

En algunas ocasiones, en la lámina de titanio se puede ver crecer el hueso de manera que una pequeña porción de hueso en crecimiento penetra por las perforaciones atravesando, por ejemplo, el límite del área 4 y el área 1. En estas ocasiones se puede distinguir una masa de hueso más calcificado en el interior de la proyección en crecimiento y una menos calcificada en el tejido más periférico (Fig. 23).

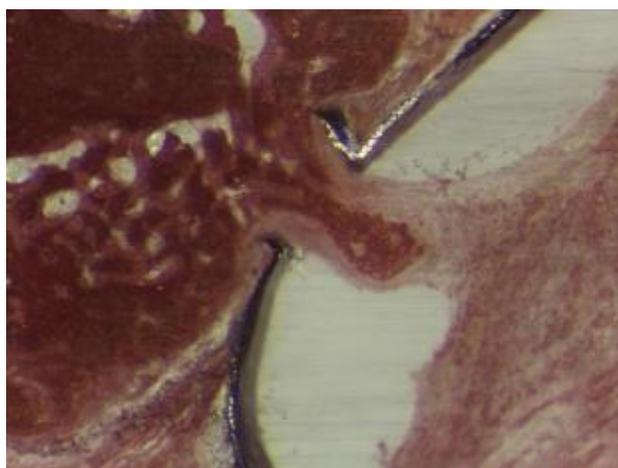


Figura 23. Región D4 de un animal del grupo D en la que se aprecia cómo el tejido óseo neoformado ha penetrado por una de las perforaciones de la lámina de titanio (en negro). Rojo de alizarina. x100.

5. Área D5

Corresponde a la región posterior a la osteotomía, es decir, como continuación del área D4. Comienza donde termina la lámina de titanio caudalmente, de forma que está constituida solamente por:

1. Hueso sin estimular.
2. Raíz del incisivo.
3. Hueso estimulado



Como explicábamos en el grupo C, esta región próxima al germen dentario, muestra una formación de nuevo tejido óseo mayor que en ninguna otra zona, de tal forma que tanto por dentro como por fuera de la lámina de titanio se observa una intensa proliferación de tejido óseo. Este tejido óseo se tiñe con alizarina de forma variable según la intensidad de la calcificación. Además, el hueso regenerado en esta región, al igual que en otras, tiene una estructura semejante al hueso procedente de la osificación membranosa.

Esta proliferación ósea en el área D5 es similar a la encontrada con mucha menor proporción en el área D2, es decir, la proliferación ósea muestra grandes trabéculas separadas por espacios también grandes, como se aprecia con el microscopio electrónico de barrido (Fig. 24).

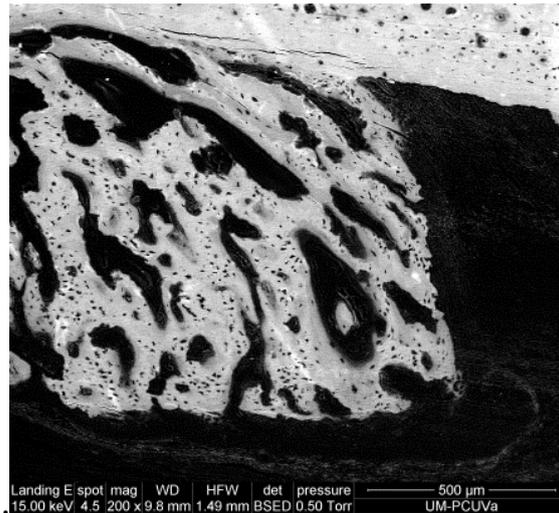


Figura 24. Hueso trabecular neoformado en la zona D5 de un animal del grupo D. Nótese el contraste con el tejido óseo compacto que aparece en la zona superior, perteneciente al hueso preexistente. Microscopía electrónica de barrido.

IV. DISCUSIÓN

En primer lugar, abordamos la discusión del nuevo método de inclusión y corte propuesto por nosotros y que ha resultado muy adecuado para obtener las preparaciones histológicas de muestras duras, como es el hueso.

De un centímetro de la pieza se obtienen mediante nuestro método de las tres secciones aproximadamente 20 secciones gruesas, de unos 300 μm cada una, cuya consistencia, dureza, plasticidad y elasticidad nos permiten manipularlas con facilidad. Tras un segundo corte, de cada sección gruesa se obtienen decenas de secciones semifinas, de entre 1 y 3 μm . Ello nos permite explorar toda la pieza a partir de las secciones gruesas en busca de áreas de interés y, una vez seleccionadas, realizar múltiples técnicas de tinción sobre las secciones semifinas.

Este método, que hemos denominado de las tres secciones, presenta grandes ventajas en relación con el clásico método de desgaste y pulido, pues éste sólo da lugar a una sección de 5 μm por cada 100 a 300 μm , espesor equivalente a nuestra sección gruesa, de la que nosotros obtenemos, como se ha dicho en el párrafo anterior, decenas de secciones semifinas. Ello permite incrementar las posibilidades de diversificación de los estudios histológicos. Además, las secciones semifinas, de entre 1 y 3 μm permiten mucha mayor resolución que las secciones de 5 μm obtenidas por el método de desgaste y pulido.

El empleo de la inclusión en resina Spurr también aporta ventajas, pues es fácil de preparar y se conoce bien la proporción de sus componentes, lo que facilita estudios de microanálisis, a diferencia de las inclusiones derivadas de metacrilato, metil-metacrilato y glicol-metacrilato, en las que la proporción de sus componentes es difícil de ajustar y, por tanto, es bastante inconsistente de un laboratorio a otro. Además, la polimerización de los derivados del

metacrilato conlleva una reacción exotérmica y algunos de sus elementos son volátiles y potencialmente peligrosos. También presenta ventajas la inclusión en epoxirresina, como la empleada en nuestro estudio, sobre los recientes métodos de inclusión acrílicos como Technovitt para cuya polimerización se debe trabajar a temperatura bajo cero (-2 a -20°C), mientras que la polimerización de las epoxirresinas se realiza fácilmente en un horno a 60°C.

Si bien es cierto que las tinciones histológicas son más fáciles de realizar en secciones en metacrilato o plásticos acrílicos que sobre epoxirresinas, pues los anticuerpos y colorantes penetran más fácilmente en aquellas al no formar puentes estables, como sí ocurre con las epoxirresinas, este inconveniente se puede soslayar mediante la desplastificación con etóxido de sodio (Bronson y Reinholt, 2008). Ejemplo de ello son los buenos resultados obtenidos por Tóth y Czoma (2011) con inmunohistoquímica en biopsias de médula ósea sin descalcificar incluidas en epoxirresina. Wittenberg et al. (2009), por su parte, ya habían descrito mejores resultados de las técnicas inmunohistoquímicas en las biopsias de hueso no descalcificado que las descalcificadas, estuvieran las piezas incluidas en resina o en parafina.

La microscopía electrónica de barrido y el microanálisis se pueden realizar tanto sobre las secciones gruesas como sobre las semifinas ya que el detector de rayos X realiza su medición sobre áreas de unos 400 µm de diámetro y profundidad. La primera sección nos permite estudiar toda la extensión de la pieza a bajo aumento y seleccionar áreas de interés que, en cortes semifinos tras la segunda sección, pueden ser estudiados con gran resolución al microscopio de luz para, a continuación, seleccionar particulares áreas de interés que, tras la tercera sección, pueden ser estudiadas al microscopio electrónico tanto de transmisión como de barrido y sus análisis elementales.

Como ya hemos señalado, según los fundamentos de la Ingeniería Tisular, es fundamental el estudio de las propiedades de los tres elementos que

constituyen un implante o injerto biocompatible: células -tanto precursoras como diferenciadas-, soportes y factores que influyen en estos procesos, como discutiremos a continuación.

En la reparación ósea, las células madre mesenquimales pueden proceder del periostio y del endostio de los huesos de origen membranoso o acompañar a los vasos en la osificación endocondral. De esta forma, una fractura puede repararse si cuenta con las condiciones adecuadas. El proceso regular de reparación de un defecto óseo, fractura, cirugía, exéresis tumoral, etc. es similar a la osteogénesis; por lo tanto, puede repararse la lesión ósea mediante procesos similares a la osificación endocondral o a la membranosa.

Las células madre derivadas del tejido adiposo presentan grandes ventajas dadas su facilidad de obtención y manejo, así como demostradas aplicaciones clínicas por sus propiedades de diferenciación y secreción paracrina de factores de crecimiento. En humanos, Redondo et al. (2018) realizaron un ensayo clínico piloto empleando un andamiaje de enlaces cruzados de suero sembrado con células madre mesenquimales para el tratamiento de quistes maxilares, resultando muy efectivo dicho tratamiento en la regeneración del hueso. Sin embargo, de la Peña et al. (2021) no encuentran diferencias en la densidad ósea tras un experimento en el que comparan a los animales tratados con un andamiaje de albúmina plasmática sembrada con osteoblastos alveolares, con los tratados sólo con dicho andamiaje, concluyendo que este andamiaje de albúmina plasmática tiene, per se, capacidad osteoinductiva.

Blanco et al. (2018), por su parte, encuentran que la regeneración ósea y la osteointegración en un defecto óseo de tamaño crítico (6 mm), practicado en cóndilos femorales de conejos, se encuentra incrementada cuando el implante de fosfato tricálcico empleado es sembrado con células madre estromales, en comparación con el implante sin dichas células, coincidiendo en ello con nuestro estudio, en el que la regeneración ósea se ve considerablemente

mejorada con la adición de células madre estromales, si bien, en su caso, éstas células son obtenidas de médula ósea xenogénica (humana) en tanto que en nuestro caso las obtuvimos de tejido adiposo de animales isogénicos.

En ninguno de nuestros animales del grupo C se han encontrado células de tejido adiposo ni células musculares en los cortes estudiados, a diferencia del grupo D, tratado con CMMTA, en el cual sí que aparecen adipocitos y miocitos, por lo que pensamos que estas células resultan de la diferenciación de las células madre mesenquimales que se sembraron sobre el implante de titanio, que han quedado separados de los estímulos de diferenciación ósea. Coincide, por tanto, nuestro estudio con lo reportado por Blanco et al. (2018) en cuanto a la ausencia de reacción inflamatoria importante, así como en la diferenciación de las células madre implantadas también hacia adipocitos y osteoclastos.

Las células madre estromales poseen propiedades inmunológicas privilegiadas debido, al parecer, a la ausencia de marcadores de superficie celular relevantes inmunológicamente, además de sus demostradas acciones inmunomoduladoras (Niemeyer et al. 2007; Ren et al. 2012), si bien otros autores han descrito resultados contrarios por falta de supervivencia o diferenciación de las células madre xenogénicas empleadas (Grinnemo et al. 2004; MacDonald et al. 2005; Wang et al. 2007; Jäger et al. 2007).

Así pues, nuestro estudio, coincidiendo con otros (Braba et al. 2017; Blanco et al. 2018), demuestra el significativo papel que juegan las células añadidas al implante en la regeneración.

En cuanto a los soportes, se ha descrito que el factor más importante que puede limitar la regeneración es la penetración de tejidos blandos, por lo que es fundamental la colocación de una membrana o lámina que, por un lado, evite la interferencia de estos tejidos no osteogénicos y, a la vez, juegue un papel activo en la promoción del proceso regenerativo, por lo que es importante

buscar materiales con propiedades bioactivas; sin olvidar, que para lograr unos buenos resultados de regeneración, debe practicarse una cirugía mínimamente invasiva, pues además de reducir las consecuencias antiestéticas y el malestar del paciente, el empleo de este tipo de técnica quirúrgica repercute beneficiosamente en la regeneración (Herrel, 2018).

El empleo de láminas en la regeneración ósea guiada no sólo protege al injerto, sino que favorece la regeneración y reduce la resorción ósea (Buser et al. 1996; Cordero et al. 2002). Schmid et al. (1994) obtuvieron, en un modelo experimental en cráneo de conejo, el mismo incremento óseo con una cápsula de titanio de techo impermeable que con una cámara similar, pero con techo permeable. En este modelo de cámara en forma de sombrero o de domo se ha obtenido un aumento del volumen del hueso neoformado tanto en barreras permeables como oclusivas siempre y cuando los bordes laterales estuvieran adaptados al hueso subyacente, comprobado tanto en animales (Schmid and Nyman 1990) como en humanos (Huser et al. 1990, Becker et al. 1994). Algunos autores han descrito la formación de una fina capa de tejido conectivo y de granulación bajo la lámina que se ha denominado pseudoperiostio (Cucchi et al. 2019), hecho que no se ha producido en nuestro estudio.

Las membranas a emplear deben tener la suficiente rigidez para mantener el espacio de separación con los tejidos blandos, pero a la vez no irritar a estos tejidos circundantes, para lo cual su espesor debe ser valorado.

Con referencia a las láminas de titanio, se han recomendado espesores entre 0,2 y 0,4 mm (Briguglio et al. 2019; Shi et al. 2022), siendo 0,4 el recomendado para impresiones en 3D (Shi et al. 2022). Nosotros hemos empleado un espesor mucho menor (12,7 μm) en nuestras láminas de titanio que nos ha permitido buena maleabilidad para moldear la lámina al orificio del defecto óseo, a la vez que confiere suficiente resistencia, no habiéndose producido una irritación significativa de los tejidos circundantes. Otras membranas, como las de poli-

éter-éter-cetona (PEEK), que son bastante usadas en craneoplastia, confieren una mayor resistencia a la tensión y elasticidad y se parecen más al hueso que el titanio.

Otro factor determinante es la porosidad de las láminas empleadas, pues lo conveniente es que se permita el paso de nutrientes, oxígeno y células osteogénicas a la vez que se impida la invasión de tejidos blandos. Las láminas no porosas no dejan que los fibroblastos crezcan en el defecto óseo, pero la falta de nutrientes dificulta la regeneración ósea. Para la penetración de tejido rico en vasos sanguíneos en soportes de colágeno se requiere un tamaño de poro mayor a 100 μm , pues poros pequeños conducen a que se rellene de tejido vascular (Chvapil et al. 1969), habiendo reportado Li et al. (2022) que una malla de PEEK con poros de 2 mm puede mantener el espacio en un defecto óseo mandibular bajo la presión masticatoria. Gutta et al. (2009), por su parte, concluyen que los macroporos facilitan la regeneración ósea en comparación con los microporos y membranas reabsorbibles, evitando la penetración de tejidos blandos y Simion et al. (2023), mediante tecnología CAD/CAM, logran un andamiaje preciso de titanio en adaptación al defecto óseo, con un espesor de 0,25 mm y un tamaño de poro de 300 μm , obteniendo así mejores resultados que con membranas de politetrafluoroetileno (PTFE).

La porosidad de los biomateriales de aleaciones de titanio mejora las propiedades mecánicas y la osteointegración, si bien los poros reducen la capacidad de carga al concentrar el estrés (Martínez Márquez et al. 2015), de manera que un incremento de la porosidad disminuye la fuerza. En un estudio con la aleación de titanio Ti-6A-14V, Zaharin et al. (2018) encuentran que poros de 300 μm rinden propiedades similares al hueso y que incrementos de dicha porosidad disminuyen el módulo y el límite elásticos. Por su parte, Bobyn et al. (1980), empleando una aleación a base de cobalto con partículas de la misma aleación, describen un óptimo crecimiento óseo y proliferación celular

en fémur de perro con poros entre 50 y 400 μm , lo que contrasta con lo reportado por Woodard et al. (2007) que encuentran mejores resultados cuando añaden microporos de 2 a 8 μm a estructuras porosas de unos 300 μm . Por su parte, Martínez-Márquez et al. (2020), tras una revisión sistemática, proponen como ideales los siguientes atributos para los implantes óseos de titanio y sus aleaciones: porosidad entre el 30% y el 70%, tamaño de poro entre 100 y 600 μm , módulo elástico 3-30 GPa, fuerza de cesión compresiva 90-170 MPa, fuerza compresiva última 180-290 MPa, resistencia a la fatiga 72,6-137 MPa a 10⁶, y 100% de interconectividad.

El poro empleado en nuestro estudio está próximo a los 400 μm , sin alcanzarlos, habiendo dado buenos resultados de regeneración en los animales del grupo C, es decir, al implante de la lámina de titanio sin adición de células, de manera que la lámina con el tamaño de poro mencionado fue suficiente para permitir una importante regeneración ósea sin verse invadido el defecto por tejidos blandos. Los resultados en los animales del grupo D superan estos resultados del grupo C, pues se comprende que, a la colocación de la lámina injertada, con la misma porosidad que en el grupo C, se suma el efecto de las células madre sembradas sobre aquella.

La superficie de las láminas se puede modificar, como decíamos en la introducción, mediante el tratamiento de la misma con abrasivos, grabado, electropulido, etc., teniéndose que considerar que las mejores condiciones higiénicas que proveen las superficies lisas tienen en contra una menor adhesión y diferenciación de las células sobre ellas sembradas. En este sentido, ha sido recomendado para la adhesión de los osteoblastos un valor de rugosidad Ra de 0,5 (Silva et al. 2009) y de 0,3 para PEEK vitrorreforzado (Procher y Mierzejewska, 2019). Asimismo, la rugosidad de la superficie incrementa la adhesión de proteínas (Zhang et al. 2018), de modo que modificaciones tanto en los niveles macro, micro como nano repercuten en las propiedades

biológicas, químicas, tribológicas y mecánicas del material (Kuneth et al. 2019; Zafar et al. 2020).

Como mayor ventaja de los materiales reabsorbibles está la mayor facilidad en su manipulación, en tanto que los no reabsorbibles los aventajan en la maleabilidad para adaptar la forma manteniendo el espacio entre membrana y defecto óseo, si bien éstos presentan como desventaja el riesgo de desplazamiento y colapso de la lámina con la consecuente reducción del espacio necesario para que la regeneración ósea tenga lugar. Así, con las láminas de titanio puede ocurrir que dehiscencias de los tejidos blandos expongan la lámina y conlleven una resorción prematura. Algunos intentos exitosos para reducir la tasa de dicha exposición de la lámina han empleado la adición de plasma rico en plaquetas (Stenport et al. 2011) o la creación de mallas personalizadas mediante la tecnología CAD/CAM (Simion et al. 2023).

Las nuevas generaciones de metales biodegradables como son las aleaciones de Mg (Yan et al. 2022) o de Zn (Jia et al. 2020) están teniendo un mayor protagonismo por sus buenas propiedades mecánicas, encontrándose una mayor osteocompatibilidad y biodegradabilidad con un sustrato basado en magnesio aplicado a un defecto óseo craneal (Agari et al. 2019). Dichas láminas tienen la ventaja de evitar una segunda intervención para su retirada.

En el debate sobre la idoneidad de unos u otros materiales debemos mencionar también las buenas propiedades mostradas por láminas de magnesio que, siendo reabsorbibles, parecen superar los inconvenientes de las membranas de colágeno (Blaskovic et al. 2023). Estas láminas poseen buena fuerza mecánica resistente a las tensiones, lo que permite movimientos como la masticación, son biocompatibles dado que el magnesio está presente en el cuerpo y su degradabilidad se extiende entre una y ocho semanas. La capacidad de estas láminas de mantener la forma mientras que se produce el período crítico de curación permite más tiempo para que las células osteoprogenitoras

prolifere a lo largo de unas ocho semanas, tiempo durante el cual el contacto con el agua de los tejidos forma una capa de hidróxido magnésico que va corroyéndose, siendo el proceso acelerado por los iones cloruro del líquido extracelular.

Otros estudios han probado la estimulación de los osteoblastos por iones magnesio, así como la producción de especies reactivas de oxígeno en las bacterias, lo que conduce al daño de éstas (Dong et al. 2023). También ha sido propuesto el estroncio como material para los soportes, considerándose este metal favorecedor de la regeneración (Liu et al. 2023). El parecido químico del estroncio con el calcio lo hace candidato a incorporarse al hueso con facilidad.

A tenor de lo dicho, no parecen existir claros resultados que determinen un mejor rendimiento a favor de las prótesis reabsorbibles o no reabsorbibles en la regeneración ósea guiada, de manera que a largo plazo la efectividad de un tipo u otro se equipara (Patit et al. 2023).

La adición de diferentes sustancias a las láminas para mejorar sus propiedades bioactivas representa otra aproximación a tener en cuenta, como es el caso de la incorporación de iones de Cu a las aleaciones de titanio, con lo que se logran propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y proangiogénicas, o de Ca, que promueve la diferenciación osteogénica (Xu et al. 2018) y de las células madre mesenquimales de la médula ósea, a la vez que reduce la producción de especies reactivas de oxígeno (Dong et al. 2023).

Los andamiajes no sólo sirven como meros soportes de matriz extracelular, también pueden actuar como liberadores de sustancias bioactivas, siendo de especial interés para estimular la regeneración ósea los factores de crecimiento que interaccionan con los receptores $TGF\beta$ y los de BMPs, péptidos como PTH1-34, P15 y P4, hormonas como la parathormona, estrógenos y vitamina D (Safari et al. 2021). Mientras que, de forma natural, los factores de

crecimiento son secretados en momentos y lugares precisos, dada su inestabilidad, la administración de los mismos se realiza en grandes dosis para lograr efectos terapéuticos, con lo que pueden ocurrir efectos adversos, como ha sido descrito con el empleo de BMP 2 utilizadas en cirugía de la columna vertebral, donde han originado serias complicaciones, como formación de hueso ectópico a la vez que resorción del implante óseo (Even et al. 2012) e incluso carcinogénesis (James et al. 2016). Por todo lo cual, es importante tomar las precauciones oportunas en el uso de estas sustancias bioactivas y buscar soportes adecuados que mimeticen al máximo la liberación fisiológica de los factores.

En esta línea, la búsqueda de los así llamados biomateriales inteligentes y constructos basados en microchips constituye un programa de investigación muy interesante y prometedor, como muestran los estudios experimentales de Zhang et al. (2024) con implantes de titanio “inteligentes” que responden a estímulos con el fin de obtener propiedades funcionales diversas, tales como protección frente a infecciones, eliminación de tumores residuales, promoción de la osteogénesis y regulación de la osteoinmunología. Así, modificaciones químicas del soporte o la incorporación de moléculas fotosensibles pueden hacer responder al implante en la dirección deseada mediante estímulos externos o internos; entre los primeros, podemos citar la fotoestimulación, principalmente con luz NIR, con campos magnéticos, estimulación eléctrica o ultrasonidos, y como ejemplo de los internos, modificaciones del pH o la temperatura, redundando todo ello en la regulación de actividades celulares o en permitir la liberación de un fármaco a demanda. Además, son muy útiles los diseños y manufacturas asistidos por ordenador, pues ayudan a adaptar tridimensionalmente los implantes a la forma anatómica necesaria para cubrir el defecto óseo, favoreciendo así una adecuada reconstrucción.

Como tratamiento analgésico tras la operación, a los animales empleados en nuestro experimento se les administró ibuprofeno. Tradicionalmente, se ha considerado que los AINEs retrasan la regeneración ósea en las fracturas (Endo et al. 2005), pero estudios experimentales más recientes (Krischak et al. 2007), así como ensayos clínicos (Aliuskevicius et al. 2019) apoyan la idea de que administrados por cortos períodos de tiempo, como una semana, no afectan la consolidación de las fracturas óseas, e incluso se ha descrito que los antiinflamatorios no esteroideos, con la aspirina a la cabeza, estimulan la regeneración mediante la activación de citoquinas, así como la angiogénesis en el área de reparación (Fattahi et al. 2022). Nuestro estudio, al emplearse por corto periodo de tiempo, corrobora la falta de efecto perjudicial del ibuprofeno en la regeneración del tejido óseo.

Algunos autores han informado de irritación del tejido y traumatismos causados por los bordes de la lámina de titanio (Watzinger et al. 2000; Schopper et al. 2001), complicaciones que no hemos encontrado en nuestro estudio, quizás por tratarse de un estudio experimental en animales, a diferencia de los anteriores cuyo estudio se realizó en humanos y, por ello, la sintomatología y las pruebas diagnósticas de seguimiento realizadas fueron más detalladas.

Todos los implantes que realizamos en los animales experimentales mostraron una elevada proporción de material teñido con la alizarina o plata, por tanto, se ha logrado favorecer la regeneración ósea, si bien tanto la cantidad de material teñido como la intensidad de la tinción puede ser diferente de unos implantes a otros, de modo que pueden aparecer zonas de una intensidad alta, media o baja, lo que consideramos indicativo de diferentes estadios de diferenciación ósea.

Así pues, nuestro estudio corrobora la idoneidad de las láminas de titanio en la promoción de la regeneración ósea guiada, en la cual la porosidad que

efectuamos en las láminas ejerció un papel importante al permitir el aporte sanguíneo a la zona y la difusión de compuestos extracelulares.

Recapitulando nuestros hallazgos, podemos decir que nuestro método de las tres secciones ofrece grandes ventajas para obtener secciones seriadas de tejidos duros y piezas grandes y poder ser estudiadas a diferentes niveles de aumentos, permitiendo realizar sobre dichas secciones un amplio rango de técnicas histológicas. Y, asimismo, podemos deducir que en la selección del material apropiado para guiar la regeneración ósea han de tenerse en cuenta múltiples factores, como son el lugar del implante, con sus características físicas y metabólicas, las propiedades mecánicas y biológicas del material y que éste provea las mayores posibilidades biomiméticas, redundando todo ello en las mejores prestaciones en osteoconducción, osteoinducción y osteointegración.

Aunque se han logrado muchas mejoras en la regeneración ósea, aún quedan muchos aspectos que resolver, los cuales son de esperar que se vayan superando tras un mayor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares subyacentes.

V. CONCLUSIONES

- 1ª) El método de las Tres Secciones resulta muy apropiado para el estudio de la regeneración ósea y de los tejidos duros en general.
- 2ª) Los defectos óseos menores de 4 mm se reparan sin la ayuda de medios externos.
- 3ª) Los defectos óseos mayores del tamaño crítico (4 mm) no consiguen regenerarse al mes sin la ayuda de un injerto.
- 4ª) Una lámina de titanio aplicada a una osteotomía del hueso mandibular se integra correctamente en dicho hueso favoreciendo su regeneración ósea.
- 5ª) Los defectos óseos de tamaño crítico (4 mm) pueden repararse mediante un implante de lámina de titanio injertado durante un mes, favoreciéndose dicha regeneración si se implanta sembrada con células madre mesenquimales.
- 6ª) Las células madre cultivadas en lámina de titanio sobreviven y se diferencian mayoritariamente en células óseas al cabo de un mes sin necesidad de osteoinductores añadidos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien CA, Economides AN, et al. . Essential Requirement of BMPs-2/4 for Both Osteoblast and Osteoclast Formation in Murine Bone Marrow Cultures From Adult Mice: Antagonism by Noggin. *J Bone Miner Res* (2000) 15:663–73. doi: 10.1359/jbmr.2000.15.4.663 - DOI - PubMed

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001 Oct;10 Suppl 2(Suppl 2):S96-101. doi: 10.1007/s005860100282. PMID: 11716023

Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*. 2013 Feb;19(2):179-92. doi: 10.1038/nm.3074. Epub 2013 Feb 6. PMID: 23389618

Basyuni S, Ferro A, Santhanam V, Birch M, McCaskie A. Systematic scoping review of mandibular bone tissue engineering. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2020 Jul;58(6):632-642. doi: 10.1016/j.bjoms.2020.03.016. Epub 2020 Apr 1. PMID: 32247521.

Behara M, Goudy S. FTY720 in immuno-regenerative and wound healing technologies for muscle, epithelial and bone regeneration. *Front Physiol*. 2023 May 12;14:1148932. doi: 10.3389/fphys.2023.1148932. eCollection 2023. PMID: 37250137

Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop*. 2007 Dec;31(6):721-7. doi: 10.1007/s00264-007-0424-8. Epub 2007 Aug 1. PMID: 17668207

Blašković M, Blašković D, Hangyasi DB, Pelozo OC, Tomas M, Čandrlić M, Rider P, Mang B, Kačarević ŽP, Trajkovski B. Evaluation between Biodegradable Magnesium Metal GBR Membrane and Bovine Graft with or without Hyaluronate. *Membranes (Basel)*. 2023 Jul 25;13(8):691. doi: 10.3390/membranes13080691. PMID: 37623752

Bolamperti S, Villa I, Rubinacci A. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Res*. 2022 Jul 18;10(1):48. doi: 10.1038/s41413-022-00219-8. PMID: 35851054

Bordukalo-Nikšić T, Kufner V, Vukičević S. The Role Of BMPs in the Regulation of Osteoclasts Resorption and Bone Remodeling: From Experimental Models to Clinical Applications. *Front Immunol*. 2022 Apr 26;13:869422. doi: 10.3389/fimmu.2022.869422. eCollection 2022. PMID: 35558080

Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal*. 2011 Apr;23(4):609-20. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.10.003. Epub 2010 Oct 16. PMID: 20959140

Buenzli PR, Sims NA. Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. *Bone*. 2015 Jun;75:144-50. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.016. Epub 2015 Feb 20. PMID: 25708054

Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(23):2347-59. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00102-2. PMID: 11055282

Buser D, Urban I, Monje A, Kunrath MF, Dahlin C. Guided bone regeneration in implant dentistry: Basic principle, progress over 35 years, and recent research activities. *Periodontol 2000*. 2023 Oct;93(1):9-25. doi: 10.1111/prd.12539. PMID: 38194351

Caire R, Roche B, Picot T, Aanei CM, He Z, Campos L, Thomas M, Malaval L, Vico L, Lafage-Proust MH. Parathyroid Hormone Remodels Bone Transitional Vessels and the Leptin Receptor-Positive Pericyte Network in Mice. *J Bone Miner Res*. 2019 Aug;34(8):1487-1501. doi: 10.1002/jbmr.3728. Epub 2019 May 17. PMID: 30920026

Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Found Symp*. 2003;249:133-43; discussion 143-7, 170-4, 239-41. PMID: 12708654

Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*. 2001 Jun;7(6):259-64. doi: 10.1016/s1471-4914(01)02016-0. PMID: 11378515

Cawley KM, Bustamante-Gomez NC, Guha AG, MacLeod RS, Xiong J, Gubrij I, Liu Y, Mulkey R, Palmieri M, Thostenson JD, Goellner JJ, O'Brien CA. Local Production of Osteoprotegerin by Osteoblasts

Suppresses Bone Resorption. *Cell Rep.* 2020 Sep 8;32(10):108052. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108052. PMID: 32905775

Chin VKL, Shinagawa A, Naclerio-Homem M da G. Bone healing of mandibular critical-size defects in spontaneously hypertensive rats. *Braz Oral Res* [Internet]. 2013 Sep;27(5):423–30. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242013000500423&lng=en&tlng=en

Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255-89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326. Epub 2014 Aug 21. PMID: 25288114

Corinaldesi G, Pieri F, Sapigni L, Marchetti C. Evaluation of survival and success rates of dental implants placed at the time of or after alveolar ridge augmentation with an autogenous mandibular bone graft and titanium mesh: a 3- to 8-year retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009 Nov-Dec;24(6):1119-28. PMID: 20162118

Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol.* 2004 May;22(5):560-7. doi: 10.1038/nbt958. Epub 2004 Apr 11. PMID: 15077117

Cowan CM, Soo C, Ting K, Wu B. Evolving concepts in bone tissue engineering. *Curr Top Dev Biol.* 2005;66:239-85. doi: 10.1016/S0070-2153(05)66008-5. PMID: 15797456

Degidi M, Scarano A, Piattelli A. Regeneration of the alveolar crest using titanium micromesh with autologous bone and a resorbable membrane. *J Oral Implantol.* 2003;29(2):86-90. doi: 10.1563/1548-1336(2003)029<0086:ROTACU>2.3.CO;2. PMID: 12760452

Delaisse JM, Andersen TL, Kristensen HB, Jensen PR, Andreasen CM, Søre K. Re-thinking the bone remodeling cycle mechanism and the origin of bone loss. *Bone.* 2020 Dec;141:115628. doi: 10.1016/j.bone.2020.115628. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32919109

Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature

Committee. *J Bone Miner Res.* 2013 Jan;28(1):2-17. doi: 10.1002/jbmr.1805. PMID: 23197339

De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174(3):101-9. doi: 10.1159/000071150. PMID: 12835573

Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R, Varela H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1992 Feb;(275):280-6. PMID: 1735226

Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, Martín-Vasallo P, Díaz-Flores L Jr. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol.* 2009 Jul;24(7):909-69. doi: 10.14670/HH-24.909. PMID: 19475537

Díaz-Flores L Jr, Madrid JF, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Argüelles H, Díaz-Flores L. Adult stem and transit-amplifying cell location. *Histol Histopathol.* 2006 Sep;21(9):995-1027. doi: 10.14670/HH-21.995. PMID: 16763950

Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature.* 2001 Nov 1;414(6859):92-7. doi: 10.1038/35102154. PMID: 11689953

Fassina L, Saino E, Sbarra MS, Visai L, De Angelis MG, Magenes G, Benazzo F. In vitro electromagnetically stimulated SAOS-2 osteoblasts inside porous hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Jun 15;93(4):1272-9. doi: 10.1002/jbm.a.32620. PMID: 19827111

Fattahi R, Mohebichamkhorami F, Khani MM, Soleimani M, Hosseinzadeh S. Aspirin effect on bone remodeling and skeletal regeneration: Review article. *Tissue Cell.* 2022 Jun;76:101753. doi: 10.1016/j.tice.2022.101753. Epub 2022 Feb 7. PMID: 35180553

Frost HM. *Bone remodeling dynamics* (Charles C Thomas Company, 1963).

Gayoso J, Garrosa M, Gayoso S, Rodríguez-Arias CA, Martín-Ferrero MÁ, Gayoso MJ. Three-sectioning method: A procedure for studying

hard tissues and large pieces under light and electron microscopy. *Micron*. 2020 May;132:102841. doi: 10.1016/j.micron.2020.102841. Epub 2020 Jan 25. PMID: 32062296

Gayoso MJ. MRT letter: a fast and easy method for general fluorescent staining of cultured cells on transparent or opaque supports. *Microsc Res Tech*. 2012 Jul;75(7):849-51. doi: 10.1002/jemt.22068. Epub 2012 May 2. PMID: 22549962

Giannoudis PV, Pountos I. Tissue regeneration. The past, the present and the future. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 4:S2-5. doi: 10.1016/j.injury.2005.10.006. Epub 2005 Nov 8. PMID: 16288758

Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*. 2011 Jan;45(1):14-24. doi: 10.1258/la.2010.010085. Epub 2010 Dec 14. PMID: 21156759

Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 1984;11:494-503.

Haimov H, Yosupov N, Pinchasov G, Juodzbaly G. Bone Morphogenetic Protein Coating on Titanium Implant Surface: a Systematic Review. *J Oral Maxillofac Res*. 2017 Jun 30;8(2):e1. doi: 10.5037/jomr.2017.8201. eCollection 2017 Apr-Jun. PMID: 28791077

Hall, B. K. The Embryonic Development of Bone. *American Scientist*. 1988 Mar-Apr;76(2), 174–181. <http://www.jstor.org/stable/27855072>

Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS, Halvorsen YD, Hitt DC, Cooper LF, Gimble JM. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng*. 2004 Mar-Apr;10(3-4):371-80. doi: 10.1089/107632704323061735. PMID: 15165454

James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, Ting K, Soo C. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016 Aug;22(4):284-97. doi: 10.1089/ten.TEB.2015.0357. Epub 2016 Apr 19. PMID: 26857241

Jia B, Yang H, Zhang Z, Qu X, Jia X, Wu Q, Han Y, Zheng Y, Dai K. Biodegradable Zn-Sr alloy for bone regeneration in rat femoral condyle defect model: In vitro and in vivo studies. *Bioact Mater*. 2020 Nov

21;6(6):1588-1604. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.11.007. eCollection 2021 Jun. PMID: 33294736

Karant D, Puleo D, Dawson D, Holliday LS, Sharab L. Characterization of 3D printed biodegradable piezoelectric scaffolds for bone regeneration. *Clin Exp Dent Res*. 2023 Apr;9(2):398-408. doi: 10.1002/cre2.712. Epub 2023 Feb 13. PMID: 36779270

Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cell Mol Life Sci*. 2017 May;74(9):1649-1657. doi: 10.1007/s00018-016-2425-5. Epub 2016 Nov 26. PMID: 27888287

Khoswanto C. Role of matrix metalloproteinases in bone regeneration: Narrative review. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2023 Sep-Oct;13(5):539-543. doi: 10.1016/j.jobcr.2023.06.002. Epub 2023 Jun 17. PMID: 37351418

Kim J, Kim SK, Heo SJ, Koak JY. Bone Formation of Titanium Implant Surfaces Treated with Submicron Poly(lactide-co-glycolide)/Recombinant Human Transforming Growth Factor- β 2 Particles by the Electrospray Method: An In Vivo Study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2019 Nov/Dec;34(6):1404-1412. doi: 10.11607/jomi.7296. PMID: 31711082

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997 May 30;89(5):755-64. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80258-5. PMID: 9182763

Kubasiewicz-Ross P, Hadzik J, Dominiak M. Osseointegration of zirconia implants with 3 varying surface textures and a titanium implant: A histological and micro-CT study. *Adv Clin Exp Med*. 2018 Sep;27(9):1173-1179. doi: 10.17219/acem/69246. PMID: 29912481

Kusuma GD, Menicanin D, Gronthos S, Manuelpillai U, Abumaree MH, Pertile MD, Brennecke SP, Kalionis B. Ectopic Bone Formation by Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Term Placenta and the Decidua. *PLoS One*. 2015 Oct 20;10(10):e0141246. doi: 10.1371/journal.pone.0141246. eCollection 2015. PMID: 26484666

Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001 May 28;153(5):1133-40. doi: 10.1083/jcb.153.5.1133. PMID: 11381097

Li Y, Li Z, Tian L, Li D, Lu B, Shi C, Niu Q, Liu F, Kong L, Zhang J. Clinical application of 3D-printed PEEK implants for repairing mandibular defects. *J Craniomaxillofac Surg.* 2022 Aug;50(8):621-626. doi: 10.1016/j.jcms.2022.06.002. Epub 2022 Jun 16. PMID: 35760658

Liao X, Chen S, Li S. [Behavior of bone formation around the porous-hollow cylindrical titanium implant composed of bone morphogenetic protein]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2003 Dec;21(6):428-31. PMID: 14732972

Lima LL, Gonçalves PF, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Guided tissue regeneration may modulate gene expression in periodontal intrabony defects: a human study. *J Periodontal Res.* 2008 Aug;43(4):459-64. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01094.x. PMID: 18503515

Lin GSS, Luddin N, Ghani HA, Lai JCH, Noorani TY. Dislodgment Resistance, Adhesive Pattern, and Dentinal Tubule Penetration of a Novel Experimental Algin Biopolymer-Incorporated Bioceramic-Based Root Canal Sealer. *Polymers (Basel).* 2023 Mar 6;15(5):1317. doi: 10.3390/polym15051317. PMID: 36904558

Liu BY, Cao G, Dong Z, Chen W, Xu JK, Guo T. The application of 3D-printed titanium mesh in maxillary tumor patients undergoing total maxillectomy. *J Mater Sci Mater Med.* 2019 Nov 14;30(11):125. doi: 10.1007/s10856-019-6326-7. PMID: 31728639

Liu X, Huang H, Zhang J, Sun T, Zhang W, Li Z. Recent Advance of Strontium Functionalized in Biomaterials for Bone Regeneration. *Bioengineering (Basel).* 2023 Mar 26;10(4):414. doi: 10.3390/bioengineering10040414. PMID: 37106601

Lossdörfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J Biomed Mater Res A.* 2004 Sep 1;70(3):361-9. doi: 10.1002/jbm.a.30025. PMID: 15293309

Luo G, Sun S, Weng T, Li X, Wang Z, Zhang B. Effect of Osteoclasts on Murine Osteoblastic Differentiation in Early Stage of Co-Culture. *Int*

J Clin Exp Med. 2016;9(2):1062–72. Available from: <https://e-century.us/files/ijcem/9/2/ijcem0015051.pdf>

Lyu R, Qu Y, Divaris K, Wu D. Methodological Considerations in Longitudinal Analyses of Microbiome Data: A Comprehensive Review. *Genes (Basel)*. 2023 Dec 28;15(1):51. doi: 10.3390/genes15010051. PMID: 38254941

Ma Q, Miri Z, Haugen HJ, Moghanian A, Loca D. Significance of mechanical loading in bone fracture healing, bone regeneration, and vascularization. *J Tissue Eng*. 2023 May 22;14:20417314231172573. doi: 10.1177/20417314231172573. eCollection 2023 Jan-Dec. PMID: 37251734

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000 Apr;21(2):115-37. doi: 10.1210/edrv.21.2.0395. PMID: 10782361

Mata A, Boehm C, Fleischman AJ, Muschler GF, Roy S. Connective tissue progenitor cell growth characteristics on textured substrates. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(3):389-406. PMID: 18019838

Miettinen SS, Jaatinen J, Pelttari A, Lappalainen R, Mönkkönen J, Venesmaa PK, Kröger HP. Effect of locally administered zoledronic acid on injury-induced intramembranous bone regeneration and osseointegration of a titanium implant in rats. *J Orthop Sci*. 2009 Jul;14(4):431-6. doi: 10.1007/s00776-009-1352-9. Epub 2009 Aug 7. PMID: 19662478

Moses O., Vitrial D., Aboodi G., Sculean A., Tal H., Kozlovsky A., et al. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. *J. Periodontol*. 2008 May;79(5):905–911. doi: 10.1902/jop.2008.070361. PMID: 18454670

Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010 Feb;16(1):123-45. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0658. PMID: 19891542

Patil S, Bhandi S, Bakri MMH, Albar DH, Alzahrani KJ, Al-Ghamdi MS, Alnfiai MM, Tovani-Palone MR. Evaluation of efficacy of non-resorbable membranes compared to resorbable membranes in patients undergoing guided bone regeneration. *Heliyon*. 2023 Feb 4;9(3):e13488.

doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13488. eCollection 2023 Mar. PMID: 36942236

Peña I, Redondo LM, Gallego L, Gonzalez S, Peña G. Técnicas y procedimientos de investigación en el animal pequeño . En: López-Cedrún JL, editor. Cirugía Oral y Maxilofacial: Atlas de procedimientos y técnicas quirúrgicas. Editorial Médica Panamericana; 2019. p. 1057-1062. ISBN 978-84-9110-112-3.

Perry DJ, Sanders DP, Nyirenda CD, Lezine-Hanna JT. Gunshot wounds to the knee. *Orthop Clin North Am.* 1995 Jan;26(1):155-63. PMID: 7838496

Poser L, Matthys R, Schawalder P, Pearce S, Alini M, Zeiter S. A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs. *Biomed Res Int.* 2014;2014:348635. doi: 10.1155/2014/348635. Epub 2014 Mar 11. PMID: 24738053

Qin L, Liu W, Cao H, Xiao G. Molecular mechanosensors in osteocytes. *Bone Res.* 2020 Jun 8;8:23. doi: 10.1038/s41413-020-0099-y. eCollection 2020. PMID: 32550039

Re F, Borsani E, Rezzani R, Sartore L, Russo D. Bone Regeneration Using Mesenchymal Stromal Cells and Biocompatible Scaffolds: A Concise Review of the Current Clinical Trials. *Gels.* 2023 May 8;9(5):389. doi: 10.3390/gels9050389.

Re F, Borsani E, Rezzani R, Sartore L, Russo D. Bone Regeneration Using Mesenchymal Stromal Cells and Biocompatible Scaffolds: A Concise Review of the Current Clinical Trials. *Gels.* 2023 May 8;9(5):389. doi: 10.3390/gels9050389. PMID: 37232981

Rentsch B, Bernhardt R, Scharnweber D, Schneiders W, Rammelt S, Rentsch C. Embroidered and surface coated polycaprolactone-co-lactide scaffolds: a potential graft for bone tissue engineering. *Biomater.* 2012 Jul-Sep;2(3):158-65. doi: 10.4161/biom.21931. PMID: 23507867

Rentsch C, Rentsch B, Scharnweber D, Zwipp H, Rammelt S. [Bone substitute. Transplants and replacement materials--an update]. *Unfallchirurg.* 2012 Oct;115(10):938-49. doi: 10.1007/s00113-012-2238-4. PMID: 22821191

Ringe J, Häupl T, Sittlinger M. [Mesenchymal stem cells for tissue engineering of bone and cartilage]. *Med Klin (Munich)*. 2003 Dec 15;98 Suppl 2:35-40. PMID: 14992201

Rocuzzo M., Ramieri G., Spada M.C., Bianchi S.D., Berrone S. Vertical alveolar ridge augmentation by means of a titanium mesh and autogenous bone grafts. *Clin. Oral Implants Res*. 2004 Feb;15(1):73–81. doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.00998.x. PMID: 14731180.

Sagheb K, Schiegnitz E, Moergel M, Walter C, Al-Nawas B, Wagner W. Clinical outcome of alveolar ridge augmentation with individualized CAD-CAM-produced titanium mesh. *Int J Implant Dent*. 2017 Dec;3(1):36. doi: 10.1186/s40729-017-0097-z. Epub 2017 Jul 26. PMID: 28748521

Saneshige S, Mano H, Tezuka K, Kakudo S, Mori Y, Honda Y, Itabashi A, Yamada T, Miyata K, Hakeda Y, et al. Retinoic acid directly stimulates osteoclastic bone resorption and gene expression of cathepsin K/OC-2. *Biochem J*. 1995 Aug 1;309 (Pt 3)(Pt 3):721-4. doi: 10.1042/bj3090721. PMID: 7639684

Sarkar N, Bose S. Controlled Delivery of Curcumin and Vitamin K2 from Hydroxyapatite-Coated Titanium Implant for Enhanced in Vitro Chemoprevention, Osteogenesis, and in Vivo Osseointegration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020 Mar 25;12(12):13644-13656. doi: 10.1021/acsami.9b22474. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32013377

Sato T, Verma S, Andrade CDC, Omeara M, Campbell N, Wang JS, Cetinbas M, Lang A, Ausk BJ, Brooks DJ, Sadreyev RI, Kronenberg HM, Lagares D, Uda Y, Pajevic PD, Bouxsein ML, Gross TS, Wein MN. A FAK/HDAC5 signaling axis controls osteocyte mechanotransduction. *Nat Commun*. 2020 Jul 1;11(1):3282. doi: 10.1038/s41467-020-17099-3. PMID: 32612176

Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defect: a histology study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994;9:13-29.

Schliephake H, Strecker N, Förster A, Schwenzer B, Reichert J, Scharnweber D. Angiogenic functionalisation of titanium surfaces using nano-anchored VEGF - an in vitro study. *Eur Cell Mater*. 2012 Mar 13;23:161-9; discussion 169. doi: 10.22203/ecm.v023a12. PMID: 22415802

Schmid J, Hämmerle CH, Olah AJ, Lang NP. Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. An experimental study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 1994 Sep;5(3):125-30. doi: 10.1034/j.1600-0501.1994.050302.x. PMID: 7827226

Schmidmaier G, Capanna R, Wildemann B, Beque T, Lowenberg D. Bone morphogenetic proteins in critical-size bone defects: what are the options? *Injury.* 2009 Dec;40 Suppl 3:S39-43. doi: 10.1016/S0020-1383(09)70010-5. PMID: 20082789

Schopper C., Goriwoda W., Moser D., Spassova E., Watzinger F., Ewers R. Long-term results after guided bone regeneration with resorbable and microporous titanium membranes. *Oral Maxillofac. Surg. Clin.* 2001;13(3):449–458. doi: 10.1016/S1042-3699(20)30130-8

Sedlmeier G, Sleeman JP. Extracellular regulation of BMP signaling: welcome to the matrix. *Biochem Soc Trans.* 2017 Feb 8;45(1):173-181. doi: 10.1042/BST20160263. PMID: 28202671

Şen S, Erber R. Neuronal Guidance Molecules in Bone Remodeling and Orthodontic Tooth Movement. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 3;23(17):10077. doi: 10.3390/ijms231710077. PMID: 36077474

Silva TS, Machado DC, Viezzer C, Silva Júnior AN, Oliveira MG. Effect of titanium surface roughness on human bone marrow cell proliferation and differentiation: an experimental study. *Acta Cir Bras.* 2009 May-Jun;24(3):200-5. doi: 10.1590/s0102-86502009000300007. PMID: 19504002

Sims NA, Martin TJ. Osteoclasts Provide Coupling Signals to Osteoblast Lineage Cells Through Multiple Mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 2020 Feb 10;82:507-529. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034425. Epub 2019 Sep 25. PMID: 31553686

Song HM, Nacamuli RP, Xia W, Bari AS, Shi YY, Fang TD, Longaker MT. High-dose retinoic acid modulates rat calvarial osteoblast biology. *J Cell Physiol.* 2005 Jan;202(1):255-62. doi: 10.1002/jcp.20115. PMID: 15389522

Spehner D, Drillien R, Proamer F, Hanau D, Edelmann L. Embedding in Spurr's resin is a good choice for immunolabelling after freeze drying as shown with chemically unfixed dendritic cells. *J Microsc.* 2002 Jul;207(Pt 1):1-4. doi: 10.1046/j.1365-2818.2002.01038.x. PMID: 12135454

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012 Oct;7(10):1918-29. doi: 10.1038/nprot.2012.113. Epub 2012 Sep 27. PMID: 23018195

Stegen S, Stockmans I, Moermans K, Thienpont B, Maxwell PH, Carmeliet P, Carmeliet G. Osteocytic oxygen sensing controls bone mass through epigenetic regulation of sclerostin. *Nat Commun.* 2018 Jul 2;9(1):2557. doi: 10.1038/s41467-018-04679-7. PMID: 29967369

Su Z, Tan P, Zhang J, Wang P, Zhu S, Jiang N. Understanding the Mechanics of the Temporomandibular Joint Osteochondral Interface from Micro- and Nanoscopic Perspectives. *Nano Lett.* 2023 Dec 27;23(24):11702-11709. doi: 10.1021/acs.nanolett.3c03564. Epub 2023 Dec 7. PMID: 38060440

Sundar R, Bhagavandas Rai A, Naveen Kumar J, Devang Divakar D. The role of Vitamin D as an adjunct for bone regeneration: A systematic review of literature. *Saudi Dent J.* 2023 Mar;35(3):220-232. doi: 10.1016/j.sdentj.2023.02.002. Epub 2023 Mar 1. PMID: 37091280

Tanaka S, Matsuzaka K, Sato D, Inoue T. Characteristics of newly formed bone during guided bone regeneration: analysis of cbfa-1, osteocalcin, and VEGF expression. *J Oral Implantol.* 2007;33(6):321-6. doi: 10.1563/1548-1336(2007)33[321:CONFBD]2.0.CO;2. PMID: 18240790

Tóth Z, Czoma V. Immunohistochemistry on epoxy resin-embedded bone marrow biopsy experience with 936 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2011 Jan;19(1):15-20. doi: 10.1097/PAI.0b013e3181ec005e. PMID: 20823769

Trobos M, Juhlin A, Shah FA, Hoffman M, Sahlin H, Dahlin C. In vitro evaluation of barrier function against oral bacteria of dense and expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes for guided bone regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018 Oct;20(5):738-748. doi: 10.1111/cid.12629. Epub 2018 Jul 24. PMID: 30039909

Trueta J. Reflections on the past and present treatment of war wounds and fractures. *Mil Med.* 1976 Apr;141(4):255-8. PMID: 817231

Turri A, Elgali I, Vazirisani F, Johansson A, Emanuelsson L, Dahlin C, Thomsen P, Omar O. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. *Biomaterials.* 2016

Apr;84:167-183. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.034. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26828682

Uehara S, Kurita H, Shimane T, Sakai H, Kamata T, Teramoto Y, Yamada S. Predictability of staged localized alveolar ridge augmentation using a micro titanium mesh. *Oral Maxillofac Surg*. 2015 Dec;19(4):411-6. doi: 10.1007/s10006-015-0513-6. Epub 2015 Jun 20. PMID: 26089132

Ullbro C, Crossner CG, Lundgren T, Stålblad PA, Renvert S. Osseointegrated implants in a patient with Papillon-Lefèvre syndrome. A 4 1/2-year follow up. *J Clin Periodontol*. 2000 Dec;27(12):951-4. doi: 10.1034/j.1600-051x.2000.027012951.x. PMID: 11140563

Umulis D, O'Connor MB, Blair SS. The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling. *Development*. 2009 Nov;136(22):3715-28. doi: 10.1242/dev.031534. PMID: 19855014

Urban IA, Lozada JL, Jovanovic SA, Nagursky H, Nagy K. Vertical ridge augmentation with titanium-reinforced, dense-PTFE membranes and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 19 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014 Jan-Feb;29(1):185-93. doi: 10.11607/jomi.3346. PMID: 24451870

Verma SK, Leikina E, Melikov K, Gebert C, Kram V, Young MF, Uygur B, Chernomordik LV. Cell-surface phosphatidylserine regulates osteoclast precursor fusion. *J Biol Chem*. 2018 Jan 5;293(1):254-270. doi: 10.1074/jbc.M117.809681. Epub 2017 Nov 3. PMID: 29101233

Wan DC, Siedhoff MT, Kwan MD, Nacamuli RP, Wu BM, Longaker MT. Refining retinoic acid stimulation for osteogenic differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Tissue Eng*. 2007 Jul;13(7):1623-31. doi: 10.1089/ten.2006.0283. PMID: 17518707

Wang X, Wu X, Xing H, Zhang G, Shi Q, E L, Liu N, Yang T, Wang D, Qi F, Wang L, Liu H. Porous Nanohydroxyapatite/Collagen Scaffolds Loading Insulin PLGA Particles for Restoration of Critical Size Bone Defect. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017 Apr 5;9(13):11380-11391. doi: 10.1021/acsami.6b13566. Epub 2017 Mar 23. PMID: 28256126

Wang Y, Li HY, Guan SY, Yu SH, Zhou Y, Zheng LW, Zhang J. Different Sources of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Comparison of Subchondral, Mandibular, and Tibia Bone-derived

Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2023 Nov 1. doi: 10.2174/011574888X260686231023091127. Online ahead of print. PMID: 37937557

Watzinger F, Luksch J, Millesi W, Schopper C, Neugebauer J, Moser D, Ewers R. Guided bone regeneration with titanium membranes: a clinical study. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000 Aug;38(4):312-5. doi: 10.1054/bjom.1999.0228. PMID: 10922157

Weivoda MM, Bradley EW. Macrophages and Bone Remodeling. *J Bone Miner Res*. 2023 Mar;38(3):359-369. doi: 10.1002/jbmr.4773. Epub 2023 Feb 3. PMID: 36651575

White AP, Vaccaro AR, Hall JA, Whang PG, Friel BC, McKee MD. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. *Int Orthop*. 2007 Dec;31(6):735-41. doi: 10.1007/s00264-007-0422-x. Epub 2007 Jul 25. PMID: 17962946

Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J*. 2003 Dec 1;22(23):6267-76. doi: 10.1093/emboj/cdg599. PMID: 14633986

Wu M, Chen G, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*. 2016 Apr 26;4:16009. doi: 10.1038/boneres.2016.9. eCollection 2016. PMID: 27563484

Yan ZY, Zhu JH, Liu GQ, Liu ZC, Guo CB, Cui NH, Han JM. Feasibility and Efficacy of a Degradable Magnesium-Alloy GBR Membrane for Bone Augmentation in a Distal Bone-Defect Model in Beagle Dogs. *Bioinorg Chem Appl*. 2022 Mar 23;2022:4941635. doi: 10.1155/2022/4941635. eCollection 2022. PMID: 35371192

Yin X, Yan L, Jun Hao D, Liu S, Yang M, He B, Liu Z. Calcium alginate template-mineral substituted hydroxyapatite hydrogel coated titanium implant for tibia bone regeneration. *Int J Pharm*. 2020 May 30;582:119303. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119303. Epub 2020 Apr 5. PMID: 32268183

Youn YH, Lee SJ, Choi GR, Lee HR, Lee D, Heo DN, Kim BS, Bang JB, Hwang YS, Correlo VM, Reis RL, Im SG, Kwon IK. Simple and facile preparation of recombinant human bone morphogenetic protein-2

immobilized titanium implant via initiated chemical vapor deposition technique to promote osteogenesis for bone tissue engineering application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Jul;100:949-958. doi: 10.1016/j.msec.2019.03.048. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30948131

Zhang R, Peng S, Zhu G. The role of secreted osteoclastogenic factor of activated T cells in bone remodeling. *Jpn Dent Sci Rev.* 2022 Nov;58:227-232. doi: 10.1016/j.jdsr.2022.07.001. Epub 2022 Jul 22. PMID: 35898473

Zimmerman LB, De Jesús-Escobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell.* 1996 Aug 23;86(4):599-606. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80133-6. PMID: 8752214

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279-95. doi: 10.1091/mbc.e02-02-0105. PMID: 12475952

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):211-28. doi: 10.1089/107632701300062859. PMID: 11304456

Zwingenberger S, Niederlohmann E, Vater C, Rammelt S, Matthys R, Bernhardt R, Valladares RD, Goodman SB, Stiehler M. Establishment of a femoral critical-size bone defect model in immunodeficient mice. *J Surg Res.* 2013 May 1;181(1):e7-e14. doi: 10.1016/j.jss.2012.06.039. Epub 2012 Jun 27. PMID: 22765996