



# Universidad Nacional Autónoma de México

## Facultad de Estudios Superiores Iztacala

---

---

### “EVALUACIÓN DE UN CONSTRUCTO HECHO MEDIANTE INGENIERÍA DE TEJIDOS EN UN MODELO DE OSTEOPOROSIS”

#### TESIS

Para obtener el título de:

**Cirujano Dentista**

Presenta:

**Estrada Hernández Mónica Gabriela**

Directora de tesis:

**Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte**

Sinodales:

**Dr. Óscar de Jesús Nieto Yáñez**

**Dr. Germán Isauro Garrido Fariña**

**Dra. Janeth Serrano Bello**

**Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez**



Facultad de Estudios Superiores  
**IZTACALA**

Investigación realizada gracias al Proyecto de CONACYT CB201401 #0235984  
y por la beca recibida al proyecto Programa de Apoyo a Proyectos para  
Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME) PE210019 de la UNAM.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



# Contenido

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
LA REGENERACIÓN ÓSEA .....	7
LA OSTEOPOROSIS Y LA MANDÍBULA.....	14
INGENIERÍA DE TEJIDOS .....	14
ÁCIDO POLI-LÁCTICO (PLA).....	16
CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSO (MSCAT).....	19
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>21</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVO .....</b>	<b>27</b>
GENERAL .....	27
ESPECÍFICOS.....	27
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>28</b>
ANDAMIO DE PLA.....	28
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
MODELO ANIMAL DE OSTEOPOROSIS .....	30
EXTRACCIÓN DE TEJIDO ADIPOSO PARA LA OBTENCIÓN DE LAS MSCAT .....	32
OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS MSCAT .....	33
SUBCULTIVOS.....	34
CONTEO CELULAR CON CÁMARA NEUBAUER .....	34
DIFERENCIACIÓN AL LINAJE OSTEOGÉNICO .....	34
ACONDICIONAMIENTO DEL PLA PREVIO A SU IMPLANTACIÓN .....	35
SEMBRADO CELULAR.....	35
DISEÑO DEL CONSTRUCTO .....	35
DISEÑO QUIRÚRGICO DEL DEFECTO ÓSEO MANDIBULAR .....	36
CONTROL RADIOGRÁFICO .....	37
CONTROL DE PESOS .....	37
CUANTIFICACIÓN DE $Ca^{+}$ EN SUERO MEDIANTE EL USO DE ESPECTROFOTÓMETRO .....	37
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	39
ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.....	40
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
EVALUACIÓN RADIOGRÁFICA DE MANDÍBULA Y MIEMBRO INFERIOR DE RATA .....	42
ANÁLISIS DE PESOS DE LOS GRUPOS OVX Y OLD.....	44
CONCENTRACIÓN DE $Ca^{+}$ EN SUERO.....	45
RESULTADOS DE LA OBSERVACIÓN CLÍNICA DE GRUPOS OVX Y OLD .....	46
RESULTADOS MORFOLÓGICOS DE GRUPOS OVX Y OLD .....	46
RESULTADOS HISTOLÓGICOS .....	50
HISTOLÓGICOS DE FÉMUR .....	50



HISTOLÓGICOS MANDIBULARES .....	54
<i>Grupo OVX-SHAM</i> .....	57
<i>Grupo OVX-PLA</i> .....	58
<i>Grupo OLD-PLA</i> .....	59
<i>Grupo OVX-MSCat</i> .....	60
<i>Grupo OLD-MSCat</i> .....	61
<i>Grupo OVX-MSCost</i> .....	62
<i>Grupo OLD-MSCost</i> .....	63
<i>Grupo OVX-PLA+MSCat</i> .....	64
<i>Grupo OLD-PLA+MSCat</i> .....	65
<i>Grupo OVX-PLA+MSCost</i> .....	66
<i>Grupo OLD-PLA+MSCost</i> .....	67
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>68</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>72</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>80</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS</b> .....	<b>80</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>81</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>84</b>



## AGRADECIMIENTOS

### A COLABORACIONES E INSTITUCIONES.

Todo mi respeto y admiración a la Dra. Cynthia Trejo Iriarte, integrante del LIO (Laboratorio de Investigación en Odontología) perteneciente a la FES Iztacala, quien me apoyo siempre durante mi vida académica, desde que era odontoblasto, hasta la realización de esta tesis, la cual marca el final de mi licenciatura. Gracias totales por motivarme, por las clases de perio, por tenerme paciencia y brindarme su amistad.

Igualmente, toda mi admiración y respeto al Dr. Germán Isauro Garrido Fariña, responsable del Laboratorio de Apoyo a la Histología y Biología, perteneciente a la FES Cuautitlán campo 4, gracias por todo el apoyo brindado en la realización de este trabajo, por la paciencia para explicarme las laminillas una y otra vez, por impulsarme a siempre ir más allá y no quedarme solamente con lo que sé.

Agradezco al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, perteneciente al Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología de la UNAM, por brindarnos el biomaterial (PLA) y de la misma forma, al M. en C. Crisóforo Mercado Márquez responsable de la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la FES Cuautitlán campo 4, por el apoyo con el espacio para la realización de los procedimientos quirúrgicos.

A mis sinodales por el apoyo en la redacción de la presente tesis, el Dr. Óscar de Jesús Nieto Yáñez perteneciente a la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la FES Iztacala, gracias por sus consejos; a la Dra. Janeth Serrano Bello perteneciente al Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Por último, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo al proyecto CB201401 #0235984 y por la beca recibida al proyecto Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME) PE210019 de la UNAM



## PERSONALES.

*A mi madre, Mary, por apoyarme en todo, por hacerme una mujer de bien, responsable y honesta. Por estar ahí con esa paciencia infinita que te caracteriza, con tu mejor consejo para todo. Siempre serás mi mayor ejemplo a seguir porque me sacaste adelante y eso no lo pago con nada, te amo y gracias infinitas.*

*A mi madrina y mi hermana, Lupita y Monse, por darme sus mejores consejos e impulsarme a seguir, gracias por estar siempre ahí, las quiero. Monse, gracias por impulsarme a realizar la tesis, me enseñaste a dar un poco más de mí.*

*A mi novio y mi mejor amigo, Isidro, gracias amor por estar conmigo largas horas frente al Photoshop, por tus consejos, tu paciencia y por darme ánimos cuando lo necesito, te amo.*

*A mis compañeros de laboratorio: Ale y Ana, muchísimas gracias por todos sus consejos y apoyo, por siempre estar dispuestas a enseñar; a pesar de que no me tocó convivir mucho con ustedes y de la distancia, siempre estuvieron ahí, gracias por su amistad, las quiero. Mario, gracias por tu infinita paciencia para enseñarme a realizar cultivos, interpretar la histología, etc. César, mil gracias por tu paciencia de santo en el INCan, con el espectrofotómetro y por resolver siempre todas mis dudas, eres un gran amigo. Shere, gracias por tus consejos y tu compañía durante el servicio. Isra, gracias por tu apoyo en el INCan y en el laboratorio. Christopher, gracias por ser mi amigo y por prestarme los libros de tu papá para la realización de esta tesis, te quiero.*



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**BMP:** Proteína Morfogénica Ósea (Bone Morphogenetic Protein)

**Ca<sup>+</sup>:** Calcio (Mineral)

**DEXA:** Densitometría Ósea por técnica de Absorciometría de rayos X de Energía Dual

**D/MEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**D/MEMS:** D/MEM Suplementado

**DMO:** Densidad Mineral Ósea

**DMOs:** Densidad de Masa Ósea

**FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)

**H&E:** Hematoxilina y Eosina

**HBSS:** Solución Salina Equilibrada de Hank's (Hank's Balanced Salt Solution)

**IT:** Ingeniería de Tejidos

**ITO:** Ingeniería de Tejidos Óseos

**MO:** Medio Osteogénico

**MSC:** Células Mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells)

**MSCat:** Células Mesenquimales de Tejido Adiposo

**MSCost:** Células Mesenquimales de Tejido Adiposo diferenciadas al linaje Osteogénico

**MT:** Medicina Traslacional

**NHI:** Instituto Nacional de Salud (National Institute of Health)

**OLD:** Ratas maduras

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**Op:** Osteoporosis

**OPMG:** Ortopantomografía

**OVX:** Ovariectomía (aplica para los grupos que tienen dicho procedimiento)

**PBS:** Solución Salina Tamponada de Fosfato (Phosphate Buffered Saline)

**PLA:** Ácido Poli-láctico (Poly-Lactic Acid)

**PLGA:** Ácido Poli-Glicólico (Polyglycolic Acid)

**UV:** Ultra Violeta

**Vitamina D:** Vit. D



# INTRODUCCIÓN

## La regeneración ósea

La Medicina Traslacional (MT) permite probar nuevas terapias en modelos de estudio controlados, para luego, llevarlos a uso clínico con seguridad y eficacia comprobada. Para que esto se lleve a cabo, se requiere evaluar previamente, la seguridad y biocompatibilidad de los biomateriales, células, señales y también es necesario saber cómo actuarán estos en combinación, es decir cuando elaboramos un constructo tridimensional, que será implantado con el objetivo de promover la regeneración ósea.

Para promover la regeneración ósea, primero es necesario comprender sus procesos y mecanismos. La osteogénesis, es definida como (Navarro, 2008): la formación de hueso nuevo, y es realizada por pre-osteoblastos y osteoblastos supervivientes en la zona del daño; Sesman-Bernal y cols. (Sesman-Bernal, 2007) la definieron como un proceso en el que se forma hueso a partir de la presencia de células mesenquimales indiferenciadas; y Almazán y cols. (Almazán, 1996) la definieron como: la formación ósea, regulada por hormonas y factores de crecimiento. Para nosotros la definición más exacta de regeneración ósea es: el proceso mediante el que se forma hueso nuevo, donde las células, hormonas y factores de crecimiento contribuyen con conjunto a este proceso.

Es importante mencionar que, a diferencia de la regeneración, la reparación ósea es el proceso en el que solo se forma un tejido cicatricial, que no tiene las mismas características del tejido original.

La remodelación ósea, por su parte, es un proceso de activación-reabsorción-formación, donde los osteoclastos se activan produciendo lagunas óseas, que serán repobladas por osteoblastos que producen matriz osteoide y cuando esta matriz se mineraliza, se restaura la morfología ósea. A este equipo de células se les denomina unidad básica multicelular (Gutiérrez Gómez, 2008) (Fig. 1).

El proceso de activación-reabsorción-formación se lleva a cabo en un periodo de tiempo de entre 3 a 6 meses en los maxilares (Li-Ru, 2019).

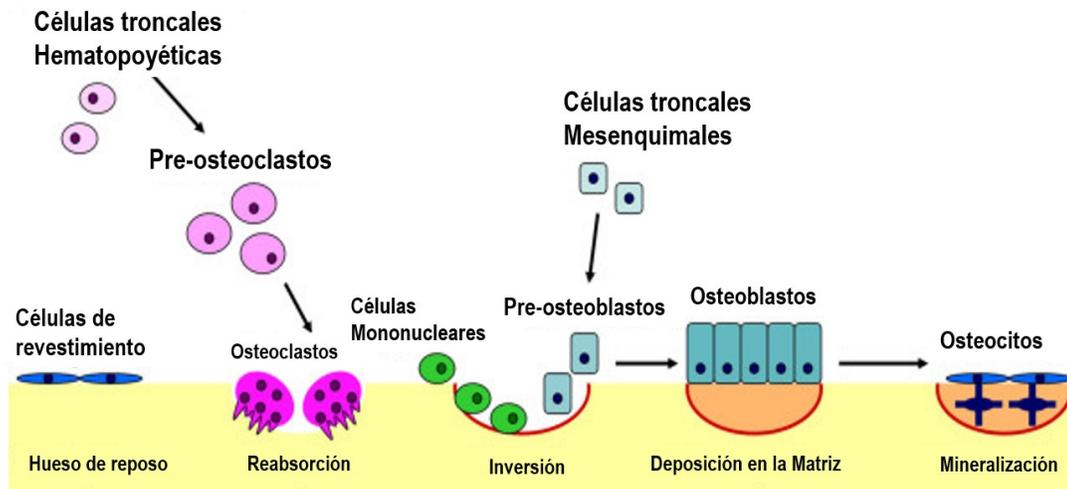


Fig. 1. Esquema que representa el proceso de remodelación ósea, en el que se observa la función de los osteoclastos, de las células mesenquimales que se inducen a pre-osteoblastos, posteriormente se modifican a osteoblastos y forman así osteocitos, que ayudan en el proceso de mineralización \*Modificado de (Kapinas, 2011).

Cuando se lleva a cabo la regeneración ósea a partir de las nuevas terapias que nos brindan la Medicina Regenerativa (MR) y la Ingeniería de Tejidos (IT), hay conceptos que se deben de tener claros:

La osteoinducción es definida por Raspall y cols (Raspall, 2006), como la transformación de las células mesenquimales indiferenciadas de la zona receptora, en células osteo-formadoras, es decir, es el proceso mediante el cual se comienza la diferenciación de células osteo-formadoras en la zona receptora para comenzar el proceso de osteogénesis.

La osteoconducción, se define como la propiedad de un biomaterial para servir de matriz, andamio o soporte a las células, (Guerrero, 2016) o bien; como la capacidad de un biomaterial para proporcionar una matriz o estructura física apropiada para la generación de hueso nuevo y al mismo tiempo, servir de guía para el crecimiento óseo (Parrales Pincay, 2018). Por lo tanto, proponemos que la osteoconducción sea definida como: la propiedad de un biomaterial para ser una estructura de soporte, que sirva a manera de matriz y guía para la regeneración del hueso y que pueda ser habitado por las células, en su mayoría pre-osteoblastos u osteoblastos y osteoclastos al mismo tiempo.



Para que la regeneración ósea se lleve a cabo, requiere de los siguiente (Molina, 2017):

1. Una fuente celular con capacidad de diferenciación al linaje óseo y que pueda ser capaz de secretar una matriz mineralizada.
2. Factores de crecimiento o citoquinas que permitan guiar este proceso.
3. Un andamio que sirva de plataforma o matriz para soportar las cargas biomecánicas, en donde puedan proliferar las células y les sirva de sustrato para su sobrevivencia, crecimiento, proliferación y diferenciación.

Existen alteraciones directamente relacionadas con estos procesos fisiológicos, como la Osteoporosis (Op).



## Osteoporosis

La Op es definida por el NHI de EE. UU. como: una enfermedad esquelética, compleja, crónica y progresiva, caracterizada por la pérdida de la densidad ósea y un deterioro en la microestructura del hueso, lo que aumenta el riesgo de fractura (Olaiz-Fernández, 2007); y la OMS en 1994, la definió como: enfermedad caracterizada por la baja masa ósea y el deterioro microestructural del tejido óseo, que lleva a una mayor fragilidad ósea y al consiguiente aumento del riesgo de fractura, la cual puede ser diagnosticada mediante la medición de la DMO que es evaluada después de una densitometría ósea mediante la técnica DEXA; definiéndola en las siguientes categorías (ver Tabla 1):

Estado	Densidad Mineral Ósea (DMO)
Normal	DMO $-1 \sigma$ (desviación estándar) en la escala T.
Osteopenia	DMO $-1$ y $-2.5 \sigma$ en la escala T.
Osteoporosis	DMO $-2.5 \sigma$ en la escala T.
Osteoporosis grave o establecida	Existen fracturas.

Tabla 1

Estado	Densidad Mineral Ósea (DMO)
Normal	DMO $-1 \sigma$ (desviación estándar) en la escala T.
Osteopenia	DMO $-1$ y $-2.5 \sigma$ en la escala T.
Osteoporosis	DMO $-2.5 \sigma$ en la escala T.
Osteoporosis grave o establecida	Existen fracturas.

Tabla 1. Tabla de medición de DMO, según la OMS (GPC. Osteoporosis, 2013).\* La escala de T es la referencia en la DMO de la población joven cuando se alcanza el punto más alto de masa ósea.

La Op es una enfermedad multifactorial provocada por la pérdida de DMO por edad, por cambios en los niveles hormonales, la nutrición [insuficiencia en la ingesta de calcio ( $Ca^+$ )] y estilo de vida (Harrison, 2006) (Rincón-Sierra, 2007).

Respecto a la pérdida de DMOs por edad, conforme envejecemos, se producen múltiples condicionantes fisiopatológicos que favorecen la aparición de la Op, como son: menor actividad osteoblástica, menor absorción intestinal de  $Ca^+$ , carencia de Vit D, baja exposición solar (ayuda en la activación de la Vit D) provocando que los huesos sean más frágiles (Hermoso de Mendoza, 2003).



En cuanto a los cambios hormonales como etiología de la Op, las mujeres son las más afectadas, ya que durante la menopausia disminuye considerablemente la función ovárica, por ende, la cantidad de estrógenos disponibles, los cuales actúan directamente en el proceso del metabolismo óseo (disminuyendo a actividad osteoblástica y aumentando la actividad osteoclástica) y la fijación del  $\text{Ca}^+$ .

En lo referente a la nutrición como etiología, en la OP hay un desequilibrio entre las entradas y salidas de  $\text{Ca}^+$  del organismo. La ingesta de  $\text{Ca}^+$  y su utilización digestiva y metabólica no son suficientes para compensar las pérdidas del  $\text{Ca}^+$  a través de las heces y orina. Normalmente en estas circunstancias y para la Op tipo II, hay una disminución en la síntesis de calcitriol, el metabolito activo de la Vit D, por un problema en la función renal donde se forma, o una insensibilidad de las células del epitelio intestinal a ella, que se cree es debido a la edad avanzada. Esto se ve agravado por un bajo nivel de Vit D, ya sea por bajas ingestas o escasa exposición a la radiación solar.

El  $\text{Ca}^+$  es el mineral más abundante en el esqueleto, aproximadamente 1000 g se encuentran en forma de cristales de hidroxapatita, que es su reservorio natural, y tiene 2 funciones principales, el mantenimiento de la estructura y la regulación metabólica (adecuada mineralización y buena densidad mineral ósea) (Harrison, 2006).

Alrededor del 75-85 % del  $\text{Ca}^+$  que se consume en la dieta, proviene de productos lácteos, por lo que se recomienda no suprimir su consumo. En mujeres posmenopáusicas mayores a 50 años, se recomienda que la ingesta de  $\text{Ca}^+$  sea de 1200 mg/día, y que la ingesta no sobrepase los 1500 mg/día, ya que su consumo excesivo puede incrementar el riesgo de litiasis renal y calcificación de arterias cardíacas y cerebrales (IMSS., 2018).



## *Epidemiología de la Op*

En México, la prevalencia de Op es del 17 % en mujeres mayores de 50 años y 1 de cada 12 mujeres de más de 50 años sufrirá fractura de cadera y el riesgo se incrementará a partir de la menopausia. Los hombres también se ven afectados por este padecimiento y aunque no existe mucha información al respecto, se sabe que el riesgo de fractura de cadera en el hombre es del 6 % después de los 50 años de edad. Por lo anterior, la Op debe considerarse un problema de salud pública, debido a que la población de edad avanzada va en aumento.

Actualmente en México, la población mayor a 50 años es de 19 millones y aumentará a 55 millones para el año 2050. Para entonces, se espera que la esperanza de vida será de 80 años (IMSS., 2018).

## *Clasificación*

Existen numerosas clasificaciones de Op basadas en diferentes criterios como: edad, etiología, etc. En la clasificación, hecha por Riggs, se consideraron variables como: la menopausia en mujeres y la edad (de 50 años en adelante), tanto en hombres como en mujeres señala dos tipos:

- **Postmenopáusica (tipo I):** es la Op producida a consecuencia del cese de la función ovárica (durante la menopausia) lo que conlleva a la pérdida de la masa ósea acelerada. La deficiencia de estrógenos, afecta el ciclo de remodelación ósea, aumentando la actividad osteoclástica y disminuyendo la actividad de los osteoblástica (Pérez Cano, 2002).
- **Senil (tipo II):** se produce en ambos sexos y en edades avanzadas, y se caracteriza por una fase lenta de pérdida ósea trabecular y cortical. Las fracturas características de este padecimiento son: fractura de cadera, región pélvica y fracturas vertebrales. El mecanismo etiológico de la Op senil no se ha descrito por completo, pero podía incluir hiperparatiroidismo secundario, deficiencia de estrógenos, déficit nutricional, así como la disminución en la función de los osteoblastos inducida por el microambiente, que afectaría a citocinas y factores de crecimiento (Ji, 2015).



## Tratamiento

En cualquier caso, se recomienda individualizar el tratamiento según las características de cada paciente. Sin embargo, podemos clasificarlo de 2 formas:

- Tratamiento preventivo:
  - Aumentar la actividad física (ejercicios de resistencia y equilibrio)
  - Reducir el consumo de tabaco y alcohol
  - Ingesta diaria de Ca<sup>+</sup> 700-1200 mg/día, Vit D 800 UI/día y proteína 0.8-1 g/kg.
- Tratamiento farmacológico:
  - Intervenciones farmacológicas, que se clasifican en: agentes antiresortivos (disminuyen resorción ósea) y agentes anabólicos (ayudan a la formación ósea)

A continuación, en las tablas 2 y 3 (ver Tabla 2 y Tabla 3 )se presenta una serie de medicamentos aprobados en México para la prevención y el tratamiento de la Op posmenopáusica:

Agentes farmacológicos utilizados para la <u>prevención</u> de la Op posmenopáusica	
Alendronato	5 mg/día o 35 mg/día
Risedronato	5 mg/día o 35 mg/día
Ácido zoledrónico	5 mg IV cada 2 años
Raloxifeno	60 mg/día
Terapia hormonal con estrógenos	Múltiples formulaciones

Tabla 2. Agentes farmacológicos aprobados para la prevención de la osteoporosis posmenopáusica (IMSS., 2018).

Agentes farmacológicos utilizados para el tratamiento de la Op posmenopáusica	
Alendronato	10 mg/día o 70 mg/día
Risedronato	5 mg/día o 35 mg/día
Ácido zoledrónico	5 mg IV anual
Raloxifeno	60 mg/día
Denosumab	60 mg SC cada 6 meses
Calcitonina	200 UI intranasal al día
Teriparatide	20 mcg/SC/día

Tabla 3. Agentes farmacológicos aprobados para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica (IMSS., 2018).



## La osteoporosis y la mandíbula

Las radiografías son el auxiliar de diagnóstico más empleado por los dentistas, entre las más comunes tenemos la OPMG dado que, nos da un panorama general de las estructuras con las que trabajamos día a día y así, realizar un mejor diagnóstico a través de ella. Renner y cols., fueron de los primeros autores en considerar la OPMG como un auxiliar en el diagnóstico de la Op. Realizaron un estudio donde examinaron a 11 mujeres postmenopáusicas, mediante una OPMG y observaron que 6 de ellas fueron diagnosticadas con Op, ya que, presentaban una mayor reabsorción de las crestas residuales que las que no padecían Op (Renner RP, 1984).

## Ingeniería de Tejidos

La MR trabaja en conjunto con la Ingeniería de Tejidos (IT), llevando a cabo la investigación donde el cuerpo ocupa sus propios recursos y en ocasiones, con ayuda de algún material biológico o extraño logran recrear células y reconstruir tejidos y órganos.

La tiene IT como objetivo la obtención de tejidos nuevos, los cuales puedan remplazar al tejido perdido y con esto, devolver la estructura y función que se ha perdido. Para esto se requiere de la construcción de modelos de tejidos equivalentes, en los que las células circundantes continúen con su proceso de remodelación sin que este nuevo biomaterial o constructo interfiera, sino que más bien, promueva esta regeneración.

Los biomateriales son materiales que pueden estar en contacto con fluidos y tejidos biológicos y ser tolerados adecuadamente, y al mismo tiempo, proveer a los tejidos la estructura ideal para dar alojamiento a nuevas células implantadas y residentes, y así, contribuir a la formación de tejido nuevo, estos materiales deben ser biocompatibles, es decir, tener la cualidad de no inducir efectos citotóxicos al organismo, en el hueso se requiere que sean reabsorbibles de manera controlada.

Los biomateriales en la regeneración ósea, tienen la función de proveer un espacio tridimensional a las células promoviendo la osteoconducción, así como tener una estructura apropiada para favorecer la regeneración de tejido nuevo y al mismo tiempo ser un vehículo liberador de moléculas o factores de crecimiento fomentando la osteoinducción.



En la Ingeniería de Tejidos Óseos (ITO) empleamos los biomateriales como andamios, que son aquellos biomateriales con un diseño específico, que sirven de soporte imitando a la matriz extracelular, utilizados en la fabricación de sistemas biológicos de reemplazo óseo (Ibañez, 2012). El andamio ideal para la ITO debe ser: altamente poroso, biocompatible, con degradación controlada y una superficie adecuada para la adhesión celular, así como fomentar la proliferación y diferenciación celular, además de contar con las propiedades mecánicas idóneas para ser un sustituto y ser degradado de forma controlada al mismo tiempo que se logra la regeneración del tejido óseo; el tamaño del poro del biomaterial del andamio en ITO debe ser entre 100 y 500  $\mu\text{m}$  (Morales Navarro, 2014) (Wu, 2018).

En conjunto, los andamios, células y de moléculas o factores de crecimiento se emplean formando un constructo (la unión de estos tres elementos) con el objetivo de fomentar la osteoconducción, como aporte principal del andamio; la osteogénesis, que es el aporte de las células empleadas y osteoinducción, que será el aporte de las señales del microambiente y de las citoquinas liberadas por la interacción del andamio con las células y el sitio del daño, para así generan nuevos tejidos. Estos constructos deben tener características similares al tejido que se desea reparar (Parenteau, 1999).



## Ácido Poli-láctico (PLA)

En la IT, el uso del PLA, fue aprobado por la FDA en 1970 para el contacto directo con fluidos biológicos (Serna L, 2011). Se ha investigado mucho acerca de este biomaterial y actualmente, es usado ampliamente en la fabricación de dispositivos médicos, como: material de sutura reabsorbible (cirugía oftálmica, toraco-abdominal, anastomosis neurológicas, etc.), en cirugía ortopédica (implantes reabsorbibles), cirugía reconstructiva craneofacial y maxilofacial (tornillos, broches, placas, grapas en tejido duro y blando), etc. (Granados, 2017).

De sus más recientes aplicaciones, podemos destacar su uso para la construcción de andamios óseos debido a su biocompatibilidad y a que presenta las siguientes características:

- Tridimensional y altamente poroso, con interconexiones para el crecimiento celular.
- Biocompatible y bioabsorbible.
- Superficie química adecuada para fijación, proliferación y diferenciación celular.
- Propiedades mecánicas acordes al sitio de implantación (Tajbakhsh, 2017).

El PLA es un poliéster que posee 2 estereoisómeros: el ácido L+ láctico y el ácido D-láctico, los dos isómeros son componentes necesarios para la síntesis del PLA. La diferencia entre estos dos, es que la configuración L+ es metabolizada en los tejidos humanos y se hidroliza en metabolitos biocompatibles, por lo que es el isómero empleado en la fabricación de dispositivos médicos. Es un ácido orgánico de origen natural, obtenido del ácido láctico, que se obtiene como producto de la fermentación del almidón de plantas como: maíz, caña de azúcar, papas, etc.

### Ventajas:

- Biodegradable, reciclable y composteable, su producción consume  $\text{CO}_2$ .
- Biocompatible, es decir, no produce efectos tóxicos o cancerígenos, bien tolerado por los tejidos, además de no interferir con la cicatrización del tejido. Se degrada mediante hidrólisis, reduciendo el riesgo de acumulación de material en el tejido.
- Procesabilidad, tiene mejor procesabilidad térmica en comparación con otros biopolímeros. Puede ser procesado por inyección, extrusión de película, moldeo por soplado, termoformado, impresión 3D (Xiao, 2012) y electrohilado, esta última es la más utilizada (Fig. 2).

La técnica de electrohilado o electrospinning permite la creación de micro y nano-fibras a través de un flujo de solución polimérica eléctricamente cargada, imitando así a la matriz extracelular. Ahorra energía, requiere de un 25-55 % menos que otros polímeros a base de petróleo y puede ser reducido hasta 10 % más para el futuro (Farah Shady, 2016).

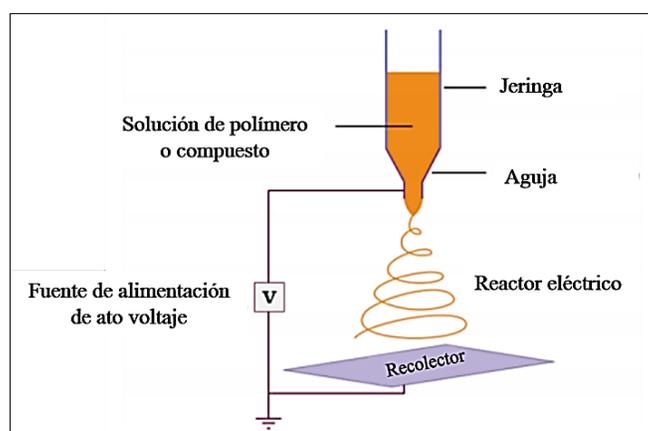


Fig. 2. Esquema del proceso de electrohilado del PLA en forma vertical, donde observamos la jeringa con el polímero que es expulsado mediante una aguja y gracias a una fuente de alto voltaje de 2 electrodos (uno a la salida de la solución y otro al plato recolector (lámina de metal) donde serán depositadas las fibras posteriores a la evaporación del disolvente. <sup>\*Modificado de</sup> (Revati, 2015).

Los andamios porosos tridimensionales de PLA se han probado previamente (Granados, 2017) (Granados-Hernández MV, 2018) (Aceves, 2018) (Aguilar, 2020) (Martínez F. J., 2017)) con células troncales mesenquimales indiferenciadas y con el uso de células inducidas a la diferenciación ósea sembradas en él, y posteriormente, implantadas en defectos óseos para evaluar el desarrollo de la regeneración ósea (Fig. 3).

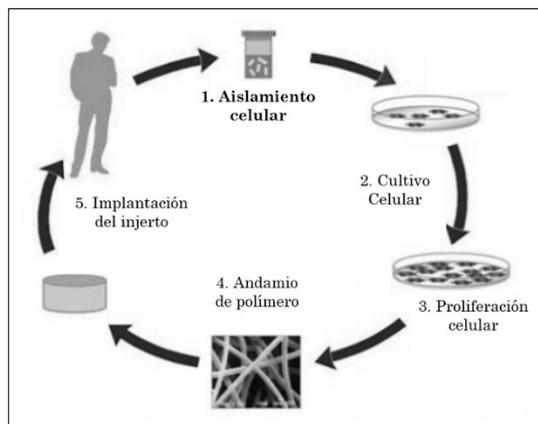


Fig. 3. Proceso de realización de un andamio.



## **Células Troncales Mesenquimales de Tejido Adiposo (MSCat)**

Las Células Troncales Mesenquimales (MSC) son células multipotentes (Fig. 4), que se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y de diferenciarse a múltiples linajes como: condrogénico, osteogénico y adipogénico principalmente. Para que una MSC se pueda emplear en la MR debe tener las cumplir con las siguientes características (Gimble, 2007):

- 1) Que se encuentren en cantidades abundantes (millones de células)
- 2) Su obtención puede ser mediante procedimientos mínimamente invasivos
- 3) Poder ser diferenciadas a múltiples linajes celulares (regulables y reproducibles)
- 4) Poder ser trasplantadas de forma segura y efectiva de forma autóloga o alogénica
- 5) Ser Manipulables

Las células troncales mesenquimales de médula ósea (BMSC) han sido las MSC más estudiadas, debido a que promueven la neo-vascularización y facilitan, con ello, el crecimiento de tejido nuevo. Sin embargo, la recolección de BMSC tiene limitaciones, debido a que los sitios de recolección (aspirado de médula ósea) suelen ser procedimientos dolorosos con reportes de morbilidad y poca aceptación de parte de los donadores.

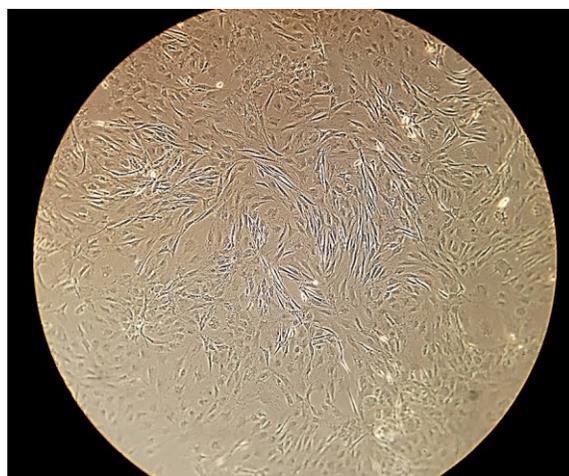
Desde 2001 Zuk PA y cols (Zuk, 2002) contribuyeron al estudio de esta estirpe celular con sus publicaciones sobre las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (MSCat). Desde entonces a la fecha existen numerosas publicaciones en las que las han estudiado, debido a que los procedimientos para su obtención son mínimamente invasivos y que pueden ser obtenidas de diferentes sitios donde el tejido adiposo es eliminado y desechado por procedimientos estéticos como: liposucciones (grasa subcutánea abdominal), grasa peritoneal o omentum, de las bolas de Bichat (en las mejillas), etc. Se demostrado ampliamente la capacidad de las MSCat de diferenciarse hacia múltiples linajes, como: el osteogénico (Fig. 5), condrogénico, adipogénico, cardiomiocítico, hepático y neurogénico (Miana, 2018) (Aceves, 2018) (Meruane & Rojas, 2010). Las MSCat que provienen del tejido adulto y presentan, como las demás MSC, tres características fundamentales: alta proliferación, alta capacidad de autorrenovación y capacidad de diferenciación (Gimble, 2007).

Para la ITO, las MSCat tienen un alto potencial osteogénico igual o superior en comparación con las BMSC (Mohamed-Ahmed, 2018) (Liao, 2014) (Ye, 2014).

Por ello, en la presente tesis, se realizó un constructo, hecho con MSCat previamente diferenciadas al linaje osteogénico (MSCost) sembradas en un andamio tridimensional y biomimético de PLA, en el que evaluamos su capacidad para promover la regeneración ósea en un defecto mandibular en un modelo de ratas osteoporóticas.



*Fig. 4. Cultivo de células MSCat a las 2 semanas.*



*Fig. 5. Cultivo de células MSCost a los 14 días post diferenciación*



## ANTECEDENTES

Hao y cols., en 2010, probaron la eficacia *in vivo* de las células mesenquimales derivadas del tejido adiposo de conejo (rASCs) transfectadas con un vector de adenovirus recombinante con la proteína morfogénica ósea humana 2 (hBMP2) en un andamio de nano-hidroxiapatita/colágena humana/ácido poliláctico (nHA/RHLC/PLA). Los grupos de estudio fueron: Grupo 1 (n=6, hBMP2/rASCs-nHA/RHLC/PLA) cultivado en medio osteogénico, Grupo 2 (n=6, rASCs no transfectadas+nHA/RHLC/PLA), Grupo 3 (n=4, nHA/RHLC/PLA) el andamio solo y Grupo 4 (n=4) grupo control. Realizaron microscopía electrónica de barrido (MEB) y se demostró la integración de las rASCs con el andamio nHA/RHLC/PLA. Utilizaron 20 conejos blancos japoneses a los que les crearon un defecto osteoperióstico segmentario de 15 mm de longitud en el radio. Después implantaron: Grupo 1 (n=6, hBMP2/rASCs-nHA/RHLC/PLA), Grupo 2 (n=6, rASCs no transfectadas+nHA/RHLC/PLA), Grupo 3 (n=4, nHA/RHLC/PLA) el andamio solo y Grupo 4 (n=4) grupo control. En sus resultados reportaron que: las rASC se adhirieron uniformemente al andamio y a los poros internos, reconociendo que el PLA proporciona buenas propiedades mecánicas. Sus análisis radiográficos arrojaron que, a las 12 semanas postquirúrgicas, solo en el grupo 1: se formó hueso en el sitio del defecto. En el grupo 2: no hubo evidencia aparente de osteogénesis; en el grupo 3: no se observó formación ósea y en el grupo 4: no hubo reparación del defecto. Los resultados histológicos arrojaron que, en el grupo 1: se observó una distribución uniforme de las rASCs en el andamio y estaba casi completamente degradado; en el grupo 2: se observó neoformación ósea y crecimiento de tejido conectivo; en el grupo 3: no se observó formación ósea y en el grupo 4: no reparó. Por lo que, ellos concluyeron, que los defectos tratados en el grupo 1 (hBMP2/rASCs-nHA/RHLC/PLA) regeneraron y el andamio se degradó completamente después de 12 semanas, debido a la modificación con el gen hBMP2; y que aunque los resultados del grupo 2 (solo las células con el andamio) no fueron tan favorables como en el grupo 1, puede llegar a ser una buena terapia el uso del andamio con células (Hao W. D., 2010).



Wang, Xing y cols., en 2016, emplearon células estromales mesenquimales de médula ósea alveolar humana (aBMSC) sembradas en un andamio de nano-hidroxiapatita/colágeno/ácido poliláctico (nHAC/PLA). Demostraron la capacidad de las aBMSC para diferenciarse a las líneas: osteogénica y adipogénica. Ellos emplearon 30 conejos hembra blancos de Nueva Zelanda, a los que les realizaron un defecto segmentario (10x5x3 mm) en el hueso alveolar de la mandíbula y les implantaron (n=6): Grupo 1 (nHAC/PLA), Grupo 2 (nHAC/PLA+aBMSCs), Grupo 3 (nHAC/PLA+aBMSCs, pre-inducidas en medio osteogénico), Grupo 4 con (AB) injerto autógeno de hueso iliaco como control positivo y Grupo 5 defecto no tratado, como control negativo; su tiempo de estudio fue de 8 semanas.

En sus resultados histológicos, reportaron que en los grupos 1 y 2: los defectos mandibulares se rellenaron con abundante tejido osteoide y algo de hueso recién formado; mientras que en el grupo 3: los defectos se rellenaron con hueso maduro y los osteoblastos cubrieron el hueso recién formado. En el grupo 4: hubo áreas del hueso autógeno, así como neoformación ósea, con diferentes disposiciones trabeculares; y en el grupo 5, se observó poca regeneración. Mediante micro-CT (reconstrucción 3D) observaron que, en el grupo 1: hubo neoformación ósea en poros abiertos del andamio, con una cicatrización incompleta del defecto. El grupo 2: cicatrizó con hueso cortical delgado. En el grupo 3: la superficie rellenó completamente con un hueso cortical grueso. En el grupo 4: los defectos cerraron bien y no hubo distinción entre el injerto y el hueso mandibular. El grupo 5: no tuvo regeneración. Por ello, concluyeron que, las BMSC pueden ser beneficiosas para el tratamiento de defectos óseos. Se demostró que la combinación de aBMSCs con inducción osteogénica y el andamio nHAC/PLA podrían restaurar los defectos mandibulares de manera efectiva, la ventaja de utilizar aBMSCs es que reduce la morbilidad y el dolor del sitio donante (como la cresta iliaca), encontrando al PLA como un buen biomaterial para la conservación de la cortical mandibular y excelente andamio para la proliferación celular (Wang, 2016).



Diomedede y cols en 2018, evaluaron los efectos regenerativos de andamios de PLA 3D enriquecidos con MSC humanas provenientes de encía (hGMSCs) complementados con vesículas extracelulares (EV) y EV diseñadas con polietilenimina (PEI). El andamio fue obtenido de una poli (láctida) comercial (PLA; Keytech srl®, Ancona, Italia), con un tamaño constante de 6 y 12mm, realizados en una impresora 3D. Los andamios fueron implantados en 24 ratas *Wistar* macho, a las que se les realizó un corte circular en la región occipital de 5 mm diámetro y 0.25 mm de altura. Se dividieron en 6 grupos (n=4): Grupo 1 (3D-PLA), grupo 2 (3D-PLA + hGMSCs), grupo 3 (3D-PLA + EVs), grupo 4 (3D-PLA + PEI-EVs), grupo 5 (3D-PLA + EVs + hGMSCs) y grupo 6 (3D-PLA + PEI-EVs + hGMSCs). Después de 6 semanas, las muestras se procesaron para su análisis. Los resultados de la evaluación histológica demostraron que, en el grupo 1, se observó matriz extracelular (MEC) sin signos de mineralización, mientras que en el grupo 2, se inició el proceso de integración con la deposición de la nueva MEC. En el grupo 3 y 5 se observó mayor crecimiento del tejido comparado con los grupos 1 y 2. En las muestras del grupo 4, fueron visibles numerosos nódulos óseos, así como varios vasos sanguíneos de diferentes dimensiones que indican una nueva formación de red vascular. Los resultados basados en la evaluación realizada a través de micro CT, demostraron que el daño óseo aún estaba presente en las muestras de los grupos 1, 2 y 3; y en los grupos 4, 5 y 6 la reparación completa del defecto fue visible. Concluyeron que, después de 6 semanas, las deposiciones de calcio fueron más evidentes en los grupos 3 y 4, donde se activa la inducción local del hueso, mejorando el proceso de mineralización, así como el desarrollo de una extensa red vascular (indicativa de osteointegración). En general, concluyeron que los PEI-EV desempeñaron un papel fundamental en la determinación del destino celular. El PLA fue un biomaterial ideal para la proliferación celular, haciéndola más ordenada y mejorando las propiedades de la creación de tejido óseo (Diomedede, 2018).



Hyun Park y cols en 2012, evaluaron la eficacia de las ASC sembradas en andamios de PLGA para tratar defectos tibiales segmentarios. Utilizaron 60 ratas *Sprague-Dawley* a las que se les realizó un defecto en la tibia de 10 mm a nivel de la diáfisis proximal y se dividieron en 3 grupos (n=20): Grupo 1 (SHAM), Grupo 2: PLGA (sin células), Grupo 3: PLGA/ASC (PLGA+ASC). Se utilizó PLGA al 10%. Una semana después de la implantación, se demostró que las células sembradas se adherían fuertemente al andamio en el grupo 3, lo cual, permitió un mayor flujo celular, mientras que en el grupo 2 no hubo buen flujo celular. La formación ósea fue evaluada radiográficamente inmediatamente después de la cirugía y 8 semanas después del tratamiento mediante MicroCT, los resultados arrojaron que la tasa de unión ósea en el grupo 1 fue del 11.1 %, en el grupo 2 fue del 26.3 % y en el grupo 3 fue del 78.9 %. Se observaron callos óseos en los bordes del defecto y un área radiopaca en los grupos 1 y 2; en el grupo 3 el área fue más grande y en su mayoría fue hueso nuevo. En el análisis de MCT, la diferencia aparente fue la mayor cantidad de hueso nuevo en el grupo 3, en comparación con los grupos 1 y 2, en los que hubo menor regeneración y no se observaron diferencias significativas entre los últimos grupos. Entonces, concluyeron que la combinación de PLGA con ASC representa una nueva y prometedora terapia para la curación de los defectos tibiales de tamaño crítico, debido a que, las ASC aceleraron y mejoraron la reparación de los defectos, además de que también promovieron la angiogénesis (Hyun Byung, 2012).



## JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, la Op está relacionada con 8.9 millones de fracturas al año, de las que 4.5 millones ocurren en América Latina y Europa. En Estados Unidos, Europa y Japón la Op afecta a más de 75 millones de personas al año. En México, se ha descrito una prevalencia del 17 % en mujeres mayores de 50 años. Aunque no es un padecimiento exclusivo de las mujeres, esta población es la más afectada debido a que, en la menopausia existe una disminución importante de estrógenos y, por ende, esto afecta la fijación del  $\text{Ca}^+$  en los huesos, haciéndolos más propensos a fracturas (Guercio, 1999).

En vista de que la Op es una enfermedad crónica y progresiva que afecta a la remodelación ósea, la regeneración ósea se convierte en un reto clínico muy importante. La pérdida ósea produce por diferentes circunstancias (traumatismo, pérdidas dentales, envejecimiento, alteraciones hormonales, infecciones, etc.) lo que nos lleva a pensar en diferentes terapias para rehabilitar. En el caso de la Op, la posibilidad de utilizar los autoinjertos (considerados como el estándar de oro) no es una opción viable para la rehabilitación de estos casos, además que el procedimiento es incómodo, costoso y el sitio donante puede presentar complicaciones.

La IT tiene nuevas terapias, como el uso de constructos hechos de biomateriales y células para restaurar o mantener la función de un órgano o tejido, que deberán ser probadas en modelos de estudio controlados, como el nuestro, en ratas osteoporóticas, lo que nos permitió evaluar la efectividad y optimizar el método en la elaboración del mismo, para mejorar la regeneración ósea.

En este trabajo, se utilizó un constructo tridimensional elaborado con un andamio de PLA y células MSCat, debido a que el PLA es un biomaterial compatible, biodegradable y poroso, considerado como un buen andamio y el uso de las MSCat puesto que, poseen una alta capacidad de proliferación, auto-renovación y diferenciación, contando como señal para inducir la regeneración ósea con el medio de inducción osteogénico.



## HIPÓTESIS

El uso de constructo tridimensional elaborado de un andamio de PLA con células MSCat pre-inducidas hacia el linaje osteogénico, sí promoverá la regeneración ósea en un modelo murino de osteoporosis.



## OBJETIVO

### General

Evaluar la regeneración ósea, utilizando un constructo tridimensional elaborado con un andamio de PLA y células MSCost, en un modelo murino de Op.

### Específicos

- Describir y comparar la regeneración ósea entre los diferentes grupos (OLD y OVX).
- Describir y comparar la regeneración ósea de las diferentes terapias empleadas sobre el defecto.
- Evaluar y comparar la capacidad de inducción hacia la regeneración ósea de constructo tridimensional elaborado con un andamio de PLA y células MSCat vs un constructo tridimensional elaborado con un andamio de PLA y células MSCost de un modelo murino de Op.



## METODOLOGÍA

Los estudios fueron realizados en el Grupo de Investigación en Células Troncales e Ingeniería de Tejidos (GICTIT), del Laboratorio de Investigación Odontológica (LIO) perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), en el Bioterio de la FESI y en la Unidad de aislamiento y Bioterio de la FES Cuautitlán Campo 4 (FESC-C4). Para ello, se contó con los avales de la comisión de Bioseguridad folio: 089, y de la comisión de ética folio: 1268, ambas de la FES-I (ver anexos).

Las ratas tuvieron un estricto trato y cuidado de acuerdo a la “NORMA Oficial Mexicana NOM-062- ZOO-1999” por lo que tuvieron agua y comida *Ad-libitum* durante todos los procedimientos, con ciclos 12:12 de luz/obscuridad; además, para garantizar su bienestar y satisfacer las necesidades de la investigación, así como reducir o eliminar las variables experimentales, los lugares donde se alojaron a las ratas y donde realizamos los procedimientos quirúrgicos, fueron: La Unidad de Aislamiento y Bioterio de FESC-C4 y en el Bioterio de la FESI.

Para todos los procedimientos quirúrgicos, los animales fueron anestesiados con Sedalphorte® Pentobarbital (40 mg/kg) y un relajante muscular de PROCIN® Xilazina (7 mg/kg); posterior a todos los procedimientos, se medicó a los especímenes con antibiótico (Bencilpenicilina sódica cristalina/Enrofloxacina 5 mg/2 mg/kg) en una sola dosis y analgésico (Tramadol 5 mg/kg) cada 24 horas durante tres días.

La eutanasia se realizó por sobre exposición de CO<sub>2</sub> y los cadáveres, así como, todos los residuos biológico/infecciosos creados se manejaron cuidadosamente de acuerdo a la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

### Andamio de PLA

El andamio de PLA al 10% (preparado con 10 gr de PLA, 75 ml de cloroformo y 25 ml de etanol mediante la técnica de electrohilado), de forma laminar con un grosor de 0.7 a 1 mm. Donados por el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología, UNAM.

## Diseño experimental

Se emplearon 48 ratas de la cepa *Wistar* de 3 meses de edad (peso 200+/-50g) que se dividieron aleatoriamente en 2 grupos de estudio (n=24) OVX y OLD, los cuales, se subdividieron en 6 grupos cada uno (n=4) (ver

GRUPO	DERECHO	IZQUIERDO	TIEMPO DE ESTUDIO
OVX	PLA+MSCat	Intacto	30 días
OVX	PLA+MSCost	Intacto	30 días
OVX	PLA	Intacto	30 días
OVX	MSCat	Intacto	30 días
OVX	MSCost	Intacto	30 días
OVX	Sham	Intacto	30 días

GRUPO	DERECHO	IZQUIERDO	TIEMPO DE ESTUDIO
OLD	PLA+MSCat	Intacto	30 días
OLD	PLA+MSCost	Intacto	30 días
OLD	PLA	Intacto	30 días
OLD	MSCat	Intacto	30 días
OLD	MSCost	Intacto	30 días
OLD	Sham	Intacto	30 días

Tabla 4). Se consideró el menor número de especímenes a utilizar para tener una suficiencia estadística en los resultados y al mismo tiempo, evitar sacrificios innecesarios.

GRUPO	DERECHO	IZQUIERDO	TIEMPO DE ESTUDIO
OVX	PLA+MSCat	Intacto	30 días
OVX	PLA+MSCost	Intacto	30 días
OVX	PLA	Intacto	30 días
OVX	MSCat	Intacto	30 días
OVX	MSCost	Intacto	30 días
OVX	Sham	Intacto	30 días

GRUPO	DERECHO	IZQUIERDO	TIEMPO DE ESTUDIO
OLD	PLA+MSCat	Intacto	30 días
OLD	PLA+MSCost	Intacto	30 días

OLD	PLA	Intacto	30 días
OLD	MSCat	Intacto	30 días
OLD	MSCost	Intacto	30 días
OLD	Sham	Intacto	30 días

Tabla 4. Tabla de los grupos OVX y OLD.

Pasado el tiempo de estudio, las ratas fueron sacrificadas por sobreexposición de CO<sub>2</sub> y las muestras obtenidas se fijaron con Paraformaldehído con PBS al 4 %.

## Modelo Animal de Osteoporosis

La mitad de los especímenes (n=24), elegidos de manera aleatoria, se les indujo osteoporosis mediante ovariectomía (OVX) bilateral. Los animales fueron pesados en una báscula digital y anestesiados vía intraperitoneal. Se afeitó la zona quirúrgica y se desinfectó con solución Antibenzil® (cloruro de benzalconio). Con un bisturí y una hoja #15, se realizó una incisión de una sola intención, en la parte ventral de la pared abdominal de aproximadamente 2 cm, hasta visualizar la zona visceral y ovarios (Fig. 6)

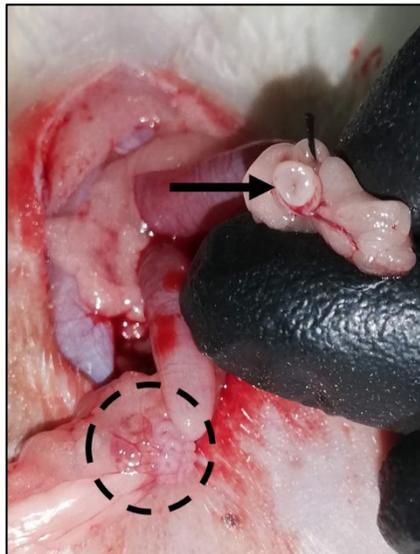


Fig. 6. Procedimiento de Ovariectomía. La flecha señala la luz de la trompa de Falopio; por el otro lado, el círculo señala el otro ovario.

Al identificar las tubas uterinas y los ovarios, se ligaron las tubas con sutura de seda 3-0's y se retiraron los ovarios. Se suturó el músculo con ácido-poliglicólico (Vicryl) 4-0's, técnica de cruz y con seda 3-0's, técnica puntos simples la zona de la piel.



Al concluir 3 meses post-ovariectomía, se realizaron radiografías de la extremidad inferior derecha de manera mensual, hasta que fue radiográficamente visible el desarrollo de la enfermedad. Se dio seguimiento con el método colorimétrico para la determinación de  $\text{Ca}^+$  en suero con el uso de un espectrofotómetro (Ca-Color AA, Laboratorios Wiener, S.A.I.C.).

## Extracción de tejido adiposo para la obtención de las MSCat

Para la extracción de la muestra de tejido adiposo subcutáneo, se emplearon de manera aleatoria, 4 ratas *Wistar* hembra de 6 meses de edad; 2 del grupo OVX y 2 del grupo OLD. Los animales fueron pesados en una báscula digital y anestesiados. Se prepararon para la cirugía, rasurándolos y realizando asepsia en el área quirúrgica. Se realizó una incisión con bisturí #15 en una sola intención de 2 cm de longitud en la zona ventral, se realizó disección roma con pinzas mosco-curvas para separar el tejido adiposo subcutáneo de la piel y se tomaron muestras, de aproximadamente 3 g (Fig. 7). El tejido se colocó en un tubo de 15 mm FALCON® con HBSS 1 % (Solución de Hank's) para su transporte y su procesamiento inmediato en el cuarto de cultivos de GICTIT. Se suturó la herida con seda 3-0's, técnica de puntos simples. Las ratas fueron medicadas con la terapia antes mencionada posterior a la cirugía.

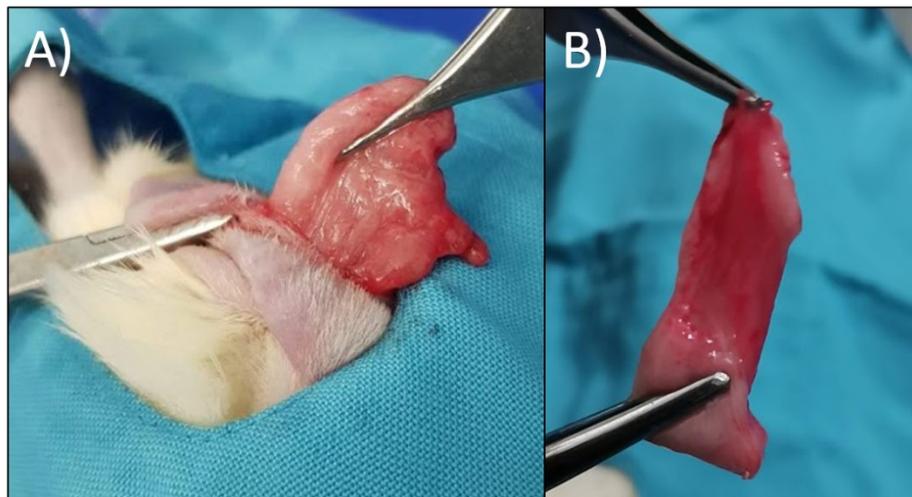


Fig. 7. Extracción de tejido adiposo; A) Proceso de extracción, B) Muestra de tejido adiposo.

## Obtención y aislamiento de las MSCat

En el cuarto de cultivos de GICTIT, LIO de la FESI se realizó la extracción de las MSCat a partir de la muestra de tejido adiposo previamente obtenida, en condiciones estériles en la cabina de Seguridad Biológica Clase II Tipo A2.

Se realizaron 3 lavados del tejido con HBSS 1 %. Posteriormente, el tejido se disgregó con bisturí y hoja #11 sobre una caja Petri. La digestión enzimática se realizó con 3 ml de colagenasa tipo I al 0.01 % Gibco® e incubados en condiciones estándares durante 45 minutos. Pasado este tiempo, la reacción fue inactivada con D/MEM Biowest® suplementado (D/MEMS) que contenía: D/MEM, FBS 10 % y Antibiótico al 1 % en una proporción 2:1, después fue tamizado por una malla de poro 100  $\mu\text{m}$ , la solución obtenida se centrifugó a 1040 rpm durante 10 minutos. Después de este proceso se obtuvieron 3 elementos: una capa de grasa del tejido adiposo, una capa acuosa y el botón celular (pellet) (Fig. 8). Se retiró el sobrenadante y al pellet se añadieron 3 ml de D/MEMS y se volvió a re-suspender, se repitió este procedimiento dos veces más.

El pellet obtenido de la última centrifugación fue re-suspendido y se sembró en 1 frasco de cultivo de 25  $\text{cm}^2$  e incubado a condiciones estándares de cultivo (atmósfera húmeda al 95%, 5% $\text{CO}_2$ , a 37°C) en una incubadora Nuaire©

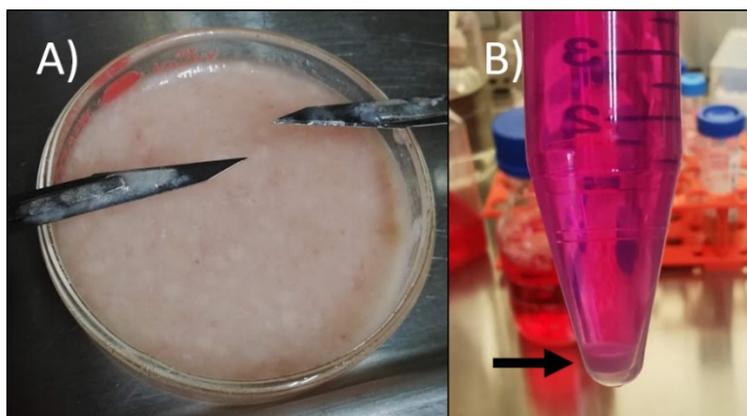


Fig. 8. A) Disgregación mecánica del tejido adiposo; B) La flecha señala el pellet, posterior a la centrifugación.

## Subcultivos

Cuando el cultivo llegó a confluencia (células poblando la superficie del frasco en un 80 % aproximadamente) se realizó un lavado con HBSS 1 % y posteriormente, se agregó 1.5 ml de tripsina al 0.1% (0.25 % Trypsin/EDTA, 0.1 % in HBSS) Biowest®, se incubó en condiciones estándares durante 3 minutos y se inactivó la reacción enzimática de la tripsina con D/MEMS en proporción 2:1. Después, se centrifugó a 1040 rpm durante 10 minutos, se realizó el conteo celular y se sembró nuevamente incubando en condiciones estándares (las células empleadas para los constructos fueron las que se encontraban entre el 3er y 4to subcultivo).

## Conteo celular con cámara Neubauer

Posterior a la centrifugación, el pellet celular fue resuspendido en 1 ml de D/MEMS. De esta resuspensión, se tomaron 50  $\mu$ l que se colocaron en un eppendorf de 0.5 ml, se le agregaron 50  $\mu$ l de azul de tripano, se resuspendió nuevamente y se tomaron 10  $\mu$ l para contar en la cámara Neubauer (Fig. 9).

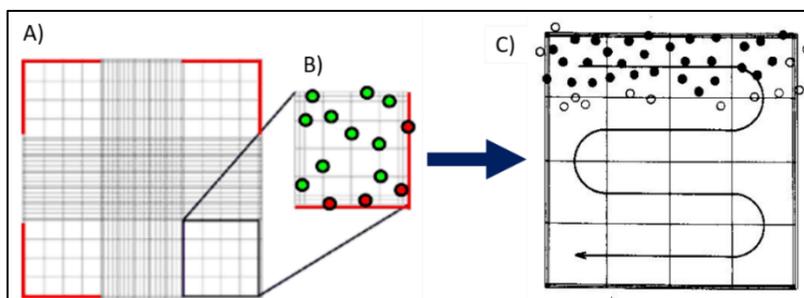


Fig. 9. Imagen de la cámara de Neubauer: A) es el grabado de la cámara (hematocitómetro) en la que, para nuestras células, se cuentan los cuadrados marcados con rojo. B) Solo contamos las células vivas, que se observan brillantes que no hayan sido teñidas por azul de tripano. C) Esquema del recuento de los campos dentro de los cuadrantes (los del margen rojo).

## Diferenciación al linaje osteogénico

Posterior al sembrado celular de las MSCat en los frascos de cultivo, se separaron la cantidad de 7 frascos de 75 cm<sup>2</sup> para colocarles MO, el cual contenía: D/MEMS, FBS 10 %, antibiótico/antimicótico 1 %, dexametasona 0.1 mM, beta-glicerol-fosfato 10 mM, ascorbato-2-fosfato 10 mM. Se realizó el cambio de medio de cultivo, cada 3 días durante 14 días, posteriormente fueron sembradas sobre el PLA.



## Acondicionamiento del PLA previo a su implantación

El PLA fue cortado en rectángulos de 4 mm de largo por 3 mm de ancho, esterilizados con rayos UV durante 30 min y colocados en una placa de 96 pocillos, por 7 días, para permear los constructos y facilitar la colonización celular. Después de 7 días, se procedió al sembrado celular (1250 células X mm<sup>2</sup>), lo que equivale a 45 000 células.

## Sembrado celular

Se suman cada uno de los cuadrantes (4 en cada cámara) y se saca el promedio de células contadas. Entonces, se puede calcular la concentración de células como:

$$N \text{ células} / (4 \times 10^{-4} \text{ ml}) = N/4 \times 10^4 \text{ células/ml}$$

Siendo N = n° total de células contadas en las 4 zonas.

Una vez conociendo la cantidad total de células en 1ml, se realizó el siguiente cálculo para sembrar las células en el PLA (sembramos 1250 células x mm<sup>2</sup>).

El sembrado de los andamios de PLA, se realizó en placas de 96 multipocillos previamente hidratado con D/MEMS, a los cuales, se les retiró el medio anterior y se les colocó D/MEMS o D/MEM osteogénico (MO), según el grupo de estudio, que se cambió cada tercer día y se mantuvieron así durante 14 días.

## Diseño del constructo

Después de los 14 días de sembrados los andamios, se colocaron con sumo cuidado uno encima de otro, para poder tener en constructo en tricapa y que en cada capa tuviera células. Una vez hecho esto, se cambió el medio de cultivo y luego, se implantaron e los defectos óseos.

## Diseño quirúrgico del defecto óseo mandibular

Transcurridos 8 meses posteriores a la ovariectomía, los animales fueron pesados y anestesiados. Se realizó una incisión de 1.5 cm a lo largo del borde inferior mandibular del lado izquierdo y disección roma, separando los músculos (masetero y buccinador), dejando expuesto el hueso mandibular. El defecto se realizó con un micromotor (Strong 210® Korea) y una fresa de bola del #4 a una velocidad menor a 1000 rpm, durante el proceso, se irrigó de manera constante con solución fisiológica. Las dimensiones del defecto fueron de: 4mm de largo (debajo de la línea oblicua externa), 3 mm de ancho y 1 mm de profundidad y fueron medidas con una sonda periodontal. Posteriormente, se colocaron las terapias correspondientes al grupo de estudio. Se suturó el músculo con ácido-poliglicólico (Vicryl) 4-0's, técnica de puntos separados (2 puntos). Para unir la piel, se suturó con seda 3-0's, técnica puntos simples. Las ratas fueron medicadas con antibiótico y analgésico, con las dosis antes mencionadas post cirugía y monitoreadas hasta el sacrificio (30 días posteriores a la cirugía) (Fig. 10).

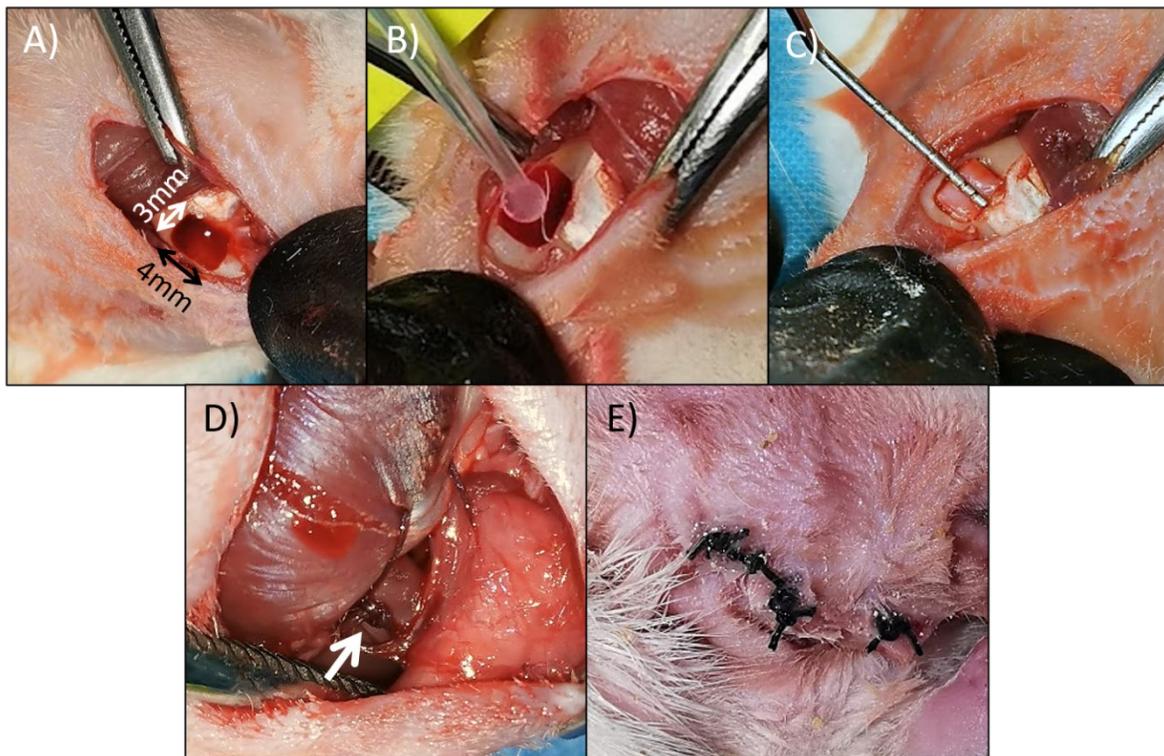


Fig. 10. A) Medidas del diseño de defecto quirúrgico; B) Defecto al que se le coloca terapia celular; C) Defecto al que se le coloca PLA; D) Sutura en musculo masetero con vicryl 4-0's, técnica de cruz (flecha blanca); E) Sutura en piel con seda 3-0's, técnica de puntos simples.



## Control radiográfico

Para el registro del progreso de la enfermedad de Op en el hueso, se tomaron radiografías a los especímenes al inicio y al final del proceso de OVX. En un equipo Rayos X Dental Corix 70 Plus USV Móvil, con películas radiográficas Dentales Carestream® de alto contraste y velocidad E de 31x41 mm. Con un tiempo de exposición de 0.5 seg.

Para tomar las radiografías, los especímenes fueron pesados y anestesiados, colocados en una posición decúbito prono.

## Control de pesos

Durante el estudio, los especímenes se pesaron de manera mensual en una báscula Digital Electrónica 0.1/1000 g de Gran Precisión marca KERN® para obtener el registro de los cambios en el peso.

El primer peso registrado fue al momento de la entrega de los especímenes, los cuales contaban con 8 semanas de edad y 200 g de peso aproximadamente y el último peso registrado fue el día del sacrificio.

## Cuantificación de $Ca^{+}$ en suero mediante el uso de espectrofotómetro

El estudio se realizó en un Espectrofotómetro digital S2150- marca Único, con un rango de longitud de onda de 325-1000 NM, del LIO.

La espectrofotometría estudia los fenómenos de interacción de la luz con la materia, por lo que pueden ocurrir algunos fenómenos: la luz se puede reflejar, transmitir o absorber.

En nuestro caso, utilizamos la *espectrofotometría de absorción* que usualmente, es usada con moléculas disueltas en un solvente transparente. La absorbancia depende linealmente de la concentración, lo que hace que esta técnica sea ideal para realizar *mediciones cuantitativas*. Esta técnica, es una excelente técnica para seguir reacciones de unión a ligando, catálisis enzimáticas y transiciones, conformacionales en proteínas y ácidos nucleicos. Las mediciones espectroscópicas son muy sensibles y se requieren pequeñas muestras de material para el análisis.

Al término del estudio, es decir, el día de la eutanasia, se tomaron muestras de sangre de los especímenes de los grupos OVX y OLD, mediante punción intracardiaca (aproximadamente 1 ml) mediante una jeringa de 1 ml; debido a que, la localización para la punción asegura el bombeo cardiaco y esto ayuda a que la muestra no se coagule antes de obtener la cantidad adecuada (Fig. 11).



Fig. 11. Fotografía del procedimiento de obtención de la muestra de sangre, en el momento de la punción intracardiaca.

Una vez tomada la muestra se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min, para obtener el plasma; esto para cuantificar niveles de  $\text{Ca}^+$  sérico a través de espectrofotómetro, un reactivo de *o-cresoltaleín complexona* (*o-CPC*) (Ca-Color AA Wiener Lab. ®) a pH alcalino, que al actuar con el  $\text{Ca}^+$ , da un complejo color magenta, el cual se mide a 570 nm.

Posteriormente, se realizó el procedimiento de la preparación de los reactivos para hacer la lectura con el espectrofotómetro (Fig. 12).



Fig. 12. Estudio en espectrofotómetro; A) Preparación de la cubeta con el reactivo, B) Cubeta colocada para la lectura.



## Análisis estadístico

Los datos de los experimentos se expresaron como la media SEM. Los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico GraphPad Prism 5.0 para Windows XP utilizando el método de ANOVA, Krus Karl Wallis con el test post hoc de comparación múltiple de Bonferroni (una cola) para comparar las medias. La significación estadística se estableció en \*  $p < 0.05$ .

## Estudios Histológicos

Durante el sacrificio, se tomaron las muestras mandibulares y fueron lavadas, se les retiró la piel y el musculo, y se fijaron en una solución de Paraformaldehído al 4% y un buffer de PBS pH 7.4. El procesamiento de las muestras fue realizado conforme al manual de “Procedimientos básicos para el Laboratorio de Apoyo y Diagnóstico” realizado por el Dr. Germán Isauro Garrido Fariña.

Las muestras fueron descalcificadas con ácido nítrico al 7.5 % en formalina amortiguada al 5.2 % durante 14 días. Posteriormente, se lavaron con agua corriente y se mantuvieron 24 hrs. en carbonato de litio al 2.5 % y formalina amortiguada al 3.7 %. Después de 24 hrs en la mencionada solución, se volvieron a enjuagar con agua corriente y se comprobó la maleabilidad del hueso. Posteriormente, las mandíbulas fueron cortadas con una hoja de micrótopo de bajo perfil en sentido vertical siguiendo el eje longitudinal del defecto (al principio del defecto) (ver Fig. 13).



*Fig. 13. Fotografía del momento en el que se realizó la sección mandibular sobre el eje longitudinal (separando porción anterior de posterior).*

Después de la deshidratación, las muestras fueron incluidas en parafina durante 2 horas, posteriormente, se incluyeron en parafina II por 2 horas a 48°C, y se realizaron los bloques histológicos.

Los cortes histológicos fueron realizados en un Microtopo Leyca® con cuchillas desechables de perfil bajo, tomados de forma seriada de entre 3-4  $\mu\text{m}$  de espesor, puestos para su expansión en un baño de flotación y con albúmina de Mayer fueron colocados sobre el portaobjetos. Posteriormente, puestos en la platina térmica y finalmente, se dejaron en la estufa a 55°C durante 1 hr para su adherencia.



Se realizó la tinción H&E (revisar anexo) siguiendo el protocolo de rutina. Se utilizó resina sintética para fijar el cubreobjetos.

Las muestras fueron observadas en el microscopio óptico Microscopio Zeiss®, modelo AxioLab A1 a 10x, 20x y 40x. Las fotografías fueron tomadas con una Cámara Canon® tipo Reflex Eos T5 y analizadas con el programa ZEN®. Posteriormente, las imágenes fueron editadas con el programa Photoshop versión CC 2015.



## RESULTADOS

### Evaluación radiográfica de mandíbula y miembro inferior de rata

Miembro inferior: en el grupo OVX se observó de manera inicial (Fig.14 A, inciso a), un hueso compacto con buena radiopacidad. En la zona de la diáfisis y meseta tibial, destacan, áreas con radiopacidad marcada en la zona cortical. Mientras que, en la radiografía OVX final (Fig.14 A, inciso b), el espacio correspondiente al hueso trabecular de la zona de la meseta tibial, se observó mayor radiolúcidez, mientras que, en la zona del hueso cortical, una radiopacidad menos marcada. En el grupo OLD, en la radiografía inicial (Fig.14 A, inciso c), observamos una rata sana y joven, con buena radiolúcidez en la zona cortical de la diáfisis tibial, en comparación a la radiografía final (Fig.14 A, inciso d), donde se nota una pérdida de la densidad ósea, cercana al margen óseo del periostio.

Mandíbula: en el grupo OVX, en la radiografía inicial (Fig.14 B, inciso a), se observa radiopacidad marcada en la zona del diastema (entre el incisivo y el primer molar) y en la línea oblicua externa de la mandíbula y en la radiografía final (Fig.14 B, inciso b), se muestra el hueso mandibular radiolúcido, tanto en la zona del diastema como en la zona del cuerpo mandibular (ver Fig. 14B inciso b). En el grupo OLD, en la radiografía inicial (ver Fig. 14B inciso c) se logra ver una radiopacidad más marcada en la zona del diastema y de la línea oblicua externa, sin embargo, aunque en la radiografía final (ver Fig. 14B inciso d), se nota la pérdida de densidad ósea en las zonas antes mencionadas, no es tan marcada como en la radiografía final del grupo OVX.

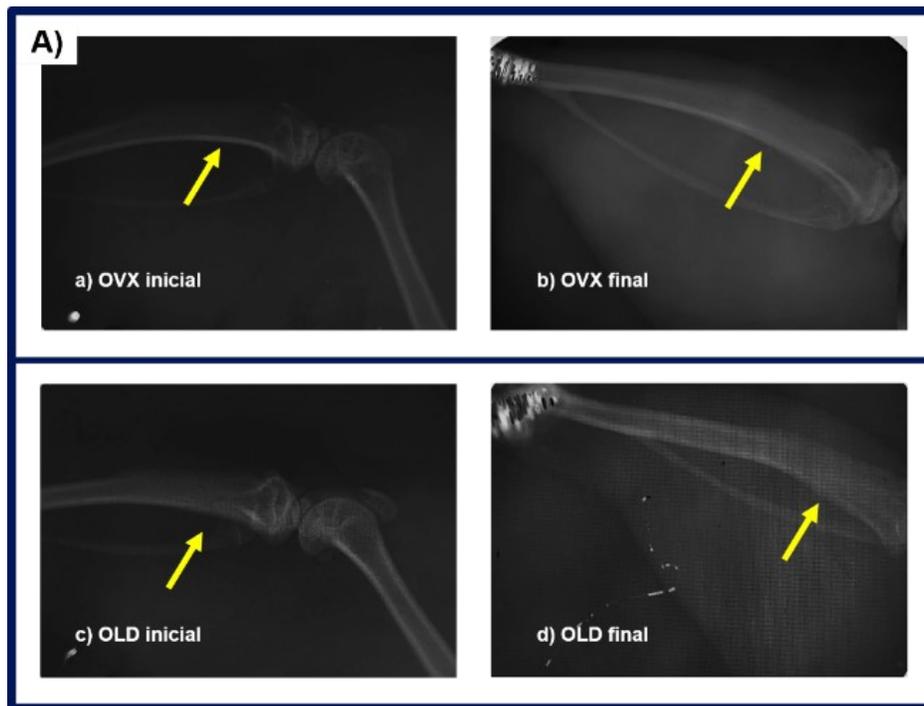
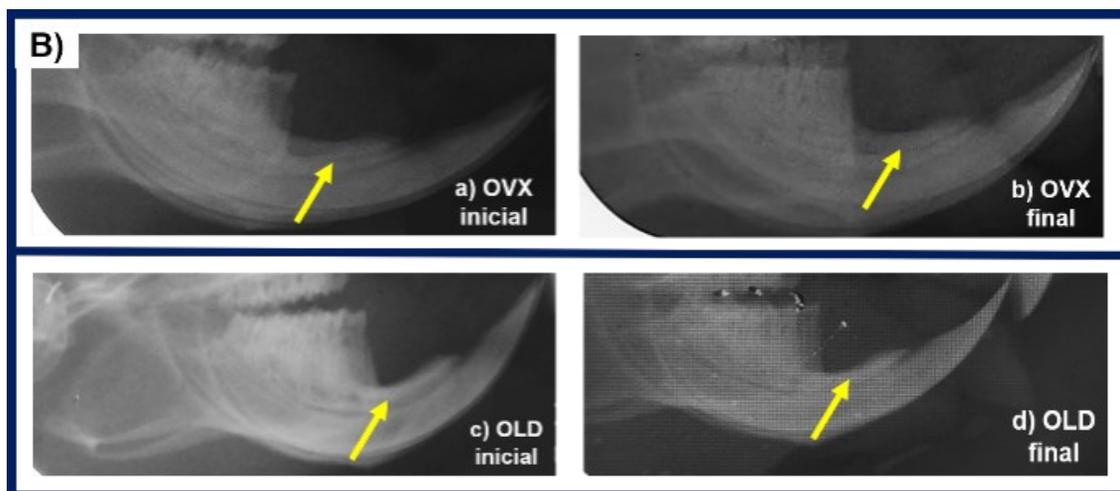


Fig. 14. A) Radiografías de miembro inferior derecho de rata, donde se observa la epífisis distal del fémur, el disco articular, la meseta tibial, la cabeza del fémur, diáfisis del peroné y tibia; a) Radiografía inicial del grupo OVX, b) Radiografía final del grupo OVX, c) Radiografía inicial del grupo OLD, d) Radiografía final del grupo OLD. Con la flecha amarilla indicamos la zona en la que se notaron más cambios en la densidad ósea.



B) Radiografía de la mandíbula de rata, se observan los incisivos, molares, cuerpo mandibular y parte del ángulo mandibular; a) Radiografía inicial del grupo OVX, b) Radiografía final del grupo OVX, c) Radiografía inicial del grupo OLD, d) Radiografía final del grupo OLD. Con la flecha amarilla indicamos la zona en la que se notaron más cambios en la densidad ósea.

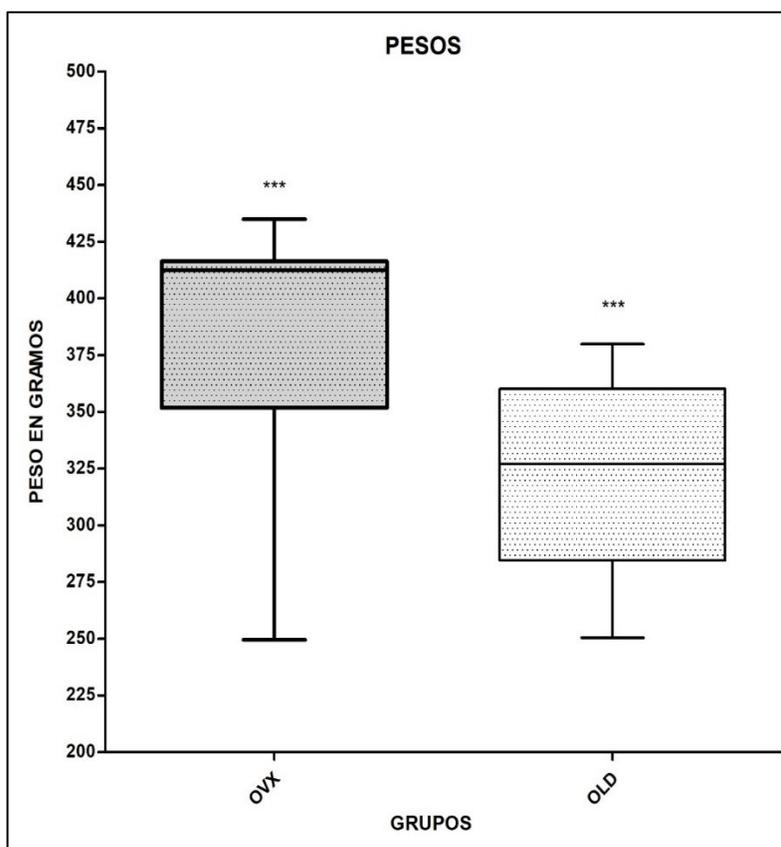
## Análisis de pesos de los grupos OVX y OLD

Se realizó una comparación entre los pesos de los especímenes OVX y OLD, donde observamos diferencias de peso entre ambos grupos (ver Gráfica 1).

En el grupo OVX, el peso más alto registrado antes del sacrificio fue de 503 g y el menor peso registrado fue de 345 g. En el grupo OLD, el peso más alto registrado fue de 399 g y el menor fue de 368 g.

La mediana está representada por la línea en la caja, en nuestro caso la mediana del grupo OVX fue de 415 g con pesos entre el segundo cuartil y el tercer cuartil (Q2-Q3) de entre 350 y 420 g; mientras que la mediana del grupo OLD fue de 325 gramos, con pesos entre el segundo cuartil y el tercer cuartil (Q2-Q3) de entre 290 y 360 g. La significación estadística fue de \*\*\*  $p < 0.0001$  (ver Graf. 2).

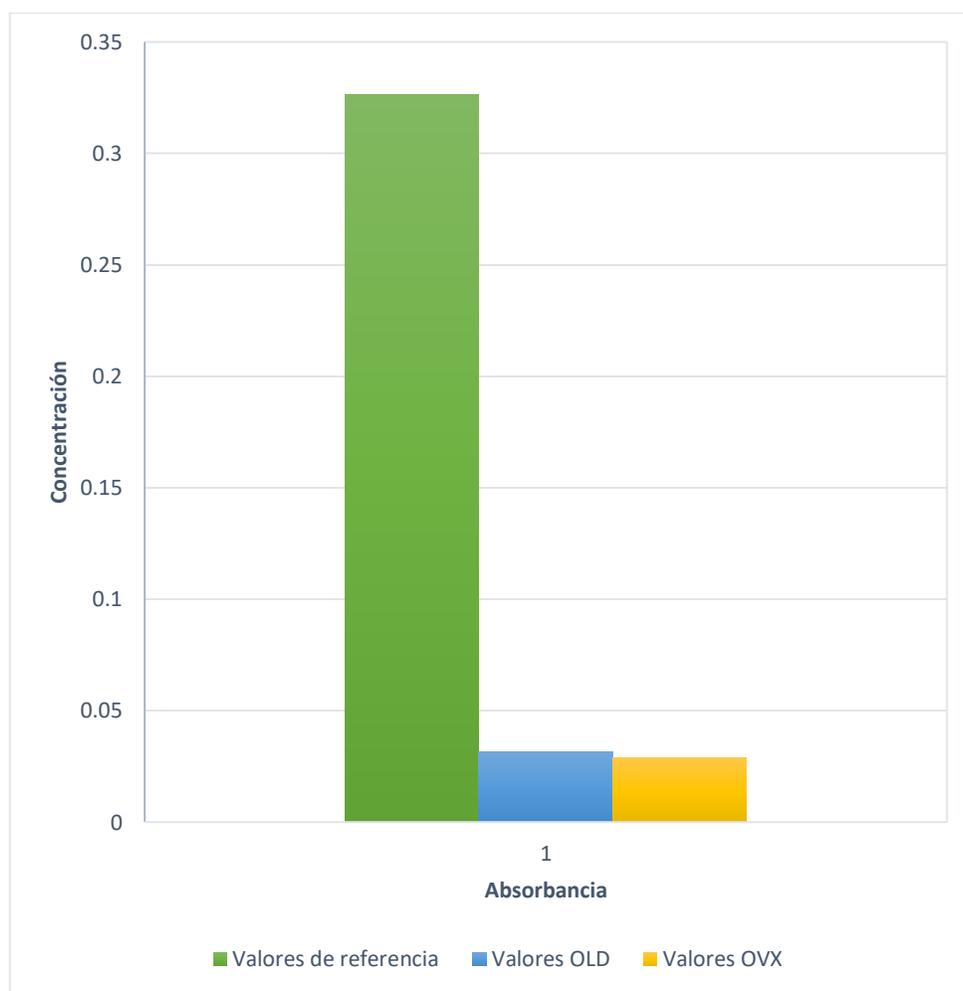
El mayor aumento de peso se observó en el grupo OVX, donde se notó un aumento de hasta un 100 % del peso inicial.



Gráfica 1. Comparación de peso entre OVX y OLD. Donde \*\*\*  $p < 0.0001$

## Concentración de $\text{Ca}^+$ en suero

Primero se realizó una curva patrón para poder calcular la concentración de  $\text{Ca}^+$ , según las instrucciones del fabricante (revisar anexo 3) (muestras color verde); posteriormente se midió la absorbancia, obteniendo así, los datos de concentración y absorbancia de las muestras de suero total de los especímenes y se introdujo la información en la ecuación despejada que describe la relación absorbancia/concentración, que se obtuvo previamente de la curva patrón (ver Gráfica 3).



Gráfica 3. Comparación de concentración de Calcio en suero entre OVX (verde) y OLD (azul).

Con esto, se observó la diferencia entre las muestras OLD (color azul) y OVX (color amarillo) debido a que estos valores no se encuentran dentro de los valores de referencia (color verde).

## Resultados de la observación clínica de grupos OVX y OLD

Grupo OVX y OLD:

- Ninguno de los especímenes presentó complicaciones quirúrgicas o alguna otra alteración al momento de la OVX.
- Ninguno de los especímenes presentó fracturas durante los 8 meses post-OVX
- No se presentaron procesos de infección.
- Los especímenes continuaron con su alimentación normal post cirugía.
- No se presentaron procesos de infección.
- Todos los especímenes cicatrizaron de acuerdo a lo esperado.

## Resultados morfológicos de grupos OVX y OLD

Posteriormente, en el momento de los sacrificios, al tomar las muestras de mandíbula, se tomaron fotografías digitales para observar los tejidos macroscópicamente. Se observó que en ambos grupos (OVX y OLD), la mandíbula se encontraba intacta y se podían observar todas las estructuras anatómicas adecuadamente (ver Fig. 15).

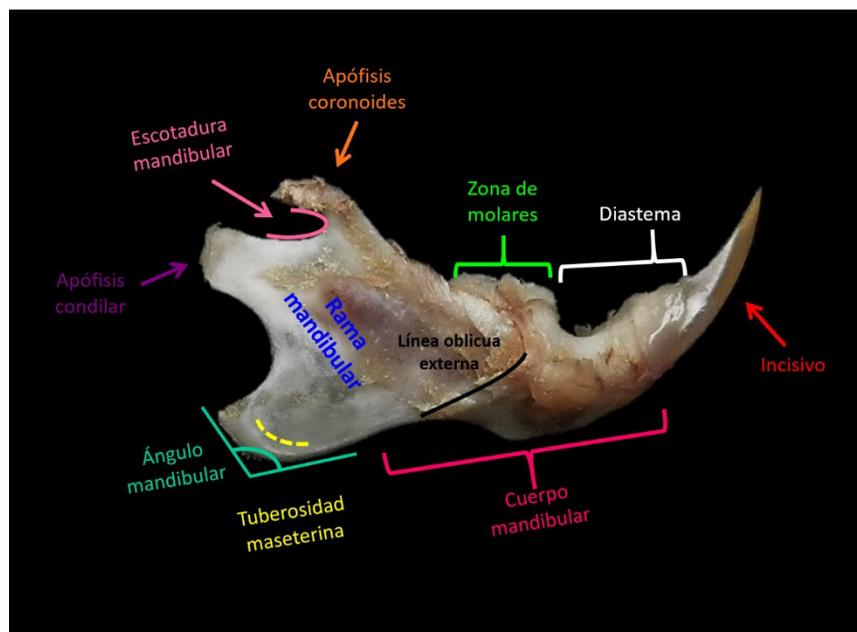


Fig. 15. Estructuras anatómicas de la mandíbula. Muestra del grupo OVX con terapia de PLA+MSCat. Observamos estructuras como: apófisis coronoides (naranja), escotadura mandibular (rosa pastel), apófisis condilar (morado), ángulo mandibular (verde aqua), tuberosidad maseterina (amarillo), cuerpo mandibular (magenta), rama mandibular (azul), zona de molares (verde), incisivo (rojo), diastema (blanco) y línea oblicua externa (negro).

En la imagen se muestran las mandíbulas intactas del grupo OLD y OVX (ver Fig. 16 A y B).

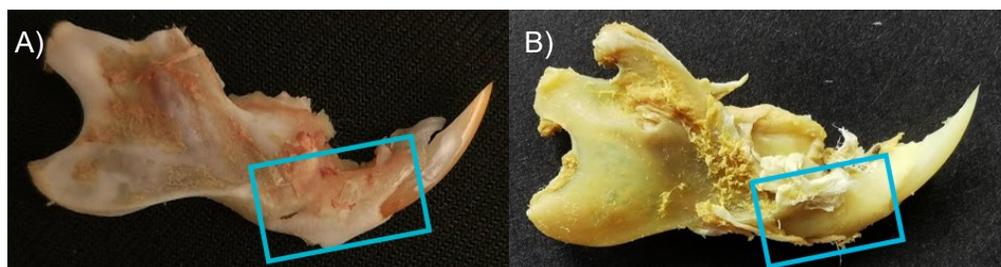


Fig. 16. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD intacta; B) Muestra del grupo OVX intacta. En el rectángulo azul se muestra el área del defecto.

En el grupo PLA se observó el biomaterial presente, cubierto por tejido de reparación. En la muestra del grupo OLD (ver Fig. 17 A) se ve un abultamiento mayor, de tejido duro en el sitio del defecto, en comparación con la muestra del grupo OVX (ver Fig. 17 B).

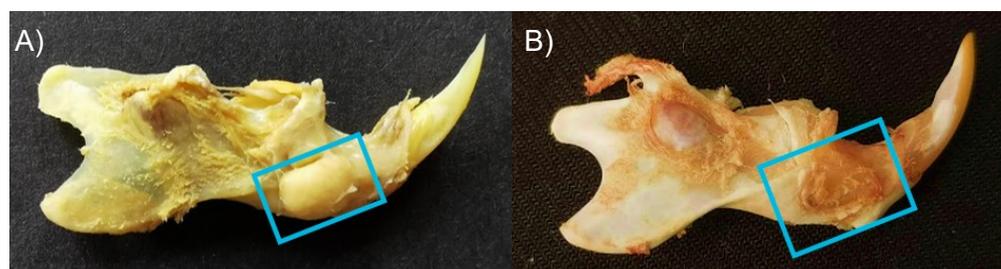


Fig. 17. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD con terapia de PLA; B) Muestra del grupo OVX con terapia de PLA. En el rectángulo azul se muestra el área del defecto.

En el grupo PLA+MSCat, se observó el biomaterial en ambos grupos OLD y OVX. En la Fig. 18, se muestra el grupo OLD (ver Fig. 18 A) donde el biomaterial no fue cubierto al 100%, sin embargo, en el grupo OVX (ver Fig. 18 B) se rebasó el grosor del hueso y el biomaterial se encontraba envuelto por una cápsula de tejido blando.

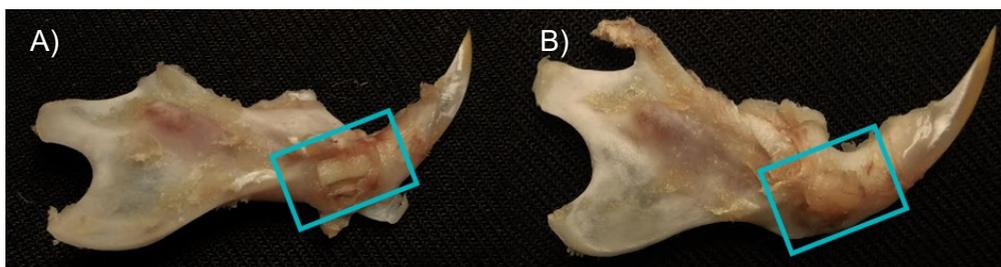
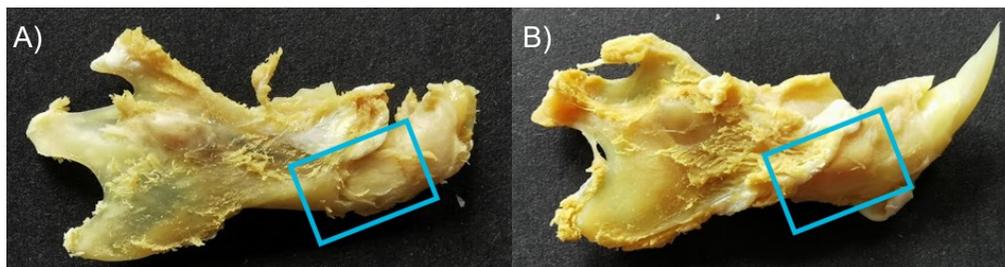


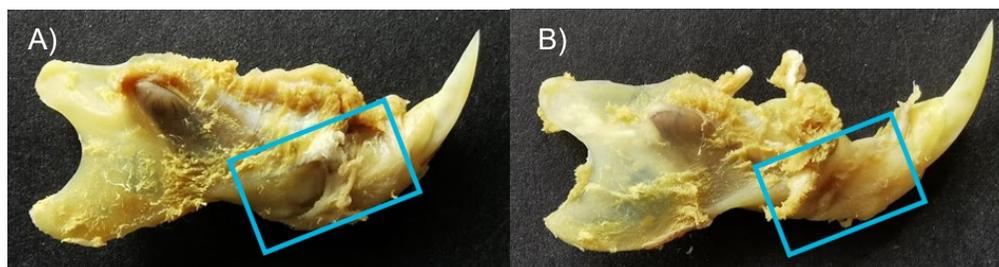
Fig. 18. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD con terapia de PLA+MSCat; B) muestra del grupo OVX con terapia de PLA+MSCat. En el rectángulo azul se muestra el área del defecto.

En el grupo OLD PLA+MSCost, el biomaterial se integró adecuadamente al tejido y dentro de los límites del defecto, sin presencia de una cápsula que lo rodeara (ver Fig. 19 A), mientras que el grupo OVX PLA+MSCost, la cápsula fue evidente, aunque de un tamaño menor en comparación con el grupo OLD PLA+MSCat (ver Fig. 19 B).



*Fig. 19. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD con terapia de PLA+MSCost; B) Muestra del grupo OVX con terapia de PLA+MSCost. En el rectángulo azul se muestra el área del defecto.*

El grupo MSCat, se observa en ambas muestras OLD y OVX (ver Fig. 20) que existe reparación del defecto de aproximadamente del 90-95 %, sin embargo, en el grupo OVX se observa una ligera concavidad en la zona del defecto (ver Fig. 20 B), mientras que, en el grupo OLD se observa un ligero abultamiento (ver Fig. 20 A).



*Fig. 20. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD con terapia de MSCat; B) Muestra del grupo OVX con terapia de MSCat. En el rectángulo azul se muestra el área del defecto.*

El grupo MSCost, en ambas muestras OLD y OVX (ver Fig. 21) el defecto se reparó aproximadamente en un 95 %. En la muestra OLD, se puede ver un ligero aumento de volumen en la zona del defecto (ver Fig. 21 A), mientras que, en el grupo OVX, la mandíbula se encuentra reparada, sin aumento de volumen (ver Fig. 21 B).

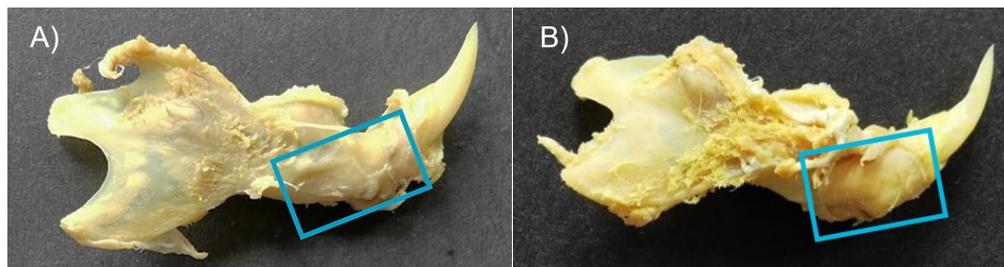


Fig. 21. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD con terapia de MSCost; B) Muestra del grupo OVX con terapia de MSCost. En el rectángulo azul se muestra el área del defecto.

El grupo Sham (cirugía sin terapia) existe tejido de reparación en aproximadamente 80 % del defecto en el grupo OLD; en el grupo OVX Sham se observa una ligera depresión en el cuerpo de la mandíbula, el defecto no se observa relleno (ver Fig. 22 B).

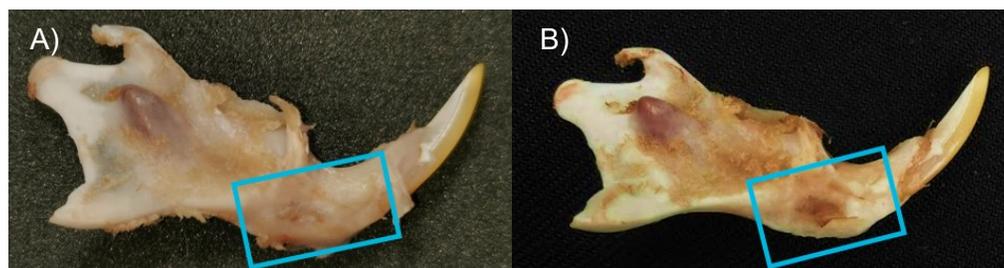


Fig. 22. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD Sham; B) Muestra del grupo OVX Sham.

## Resultados histológicos

### Histológicos de fémur

Se analizaron los cortes histológicos del fémur obtenidos de las muestras de los especímenes de los grupos OVX y OLD observando la epífisis proximal. Se comparó la histología entre los grupos, los cuales fueron cortados siguiendo el eje longitudinal del hueso. Con el fin de comprobar los cambios que tiene el hueso ante la presencia de una enfermedad ósea como la Op. En los cortes, se observó la cortical, el hueso trabecular, el periostio, las líneas de crecimiento óseo y el espacio medular.

En la muestra de fémur del grupo OVX, se observó un menor número de trabéculas, sobre el hueso compacto, con pocos espacios vasculares (flecha negra) en la zona del hueso cortical, el periostio (flecha verde) y endostio (flecha azul) se observan más delgados (ver

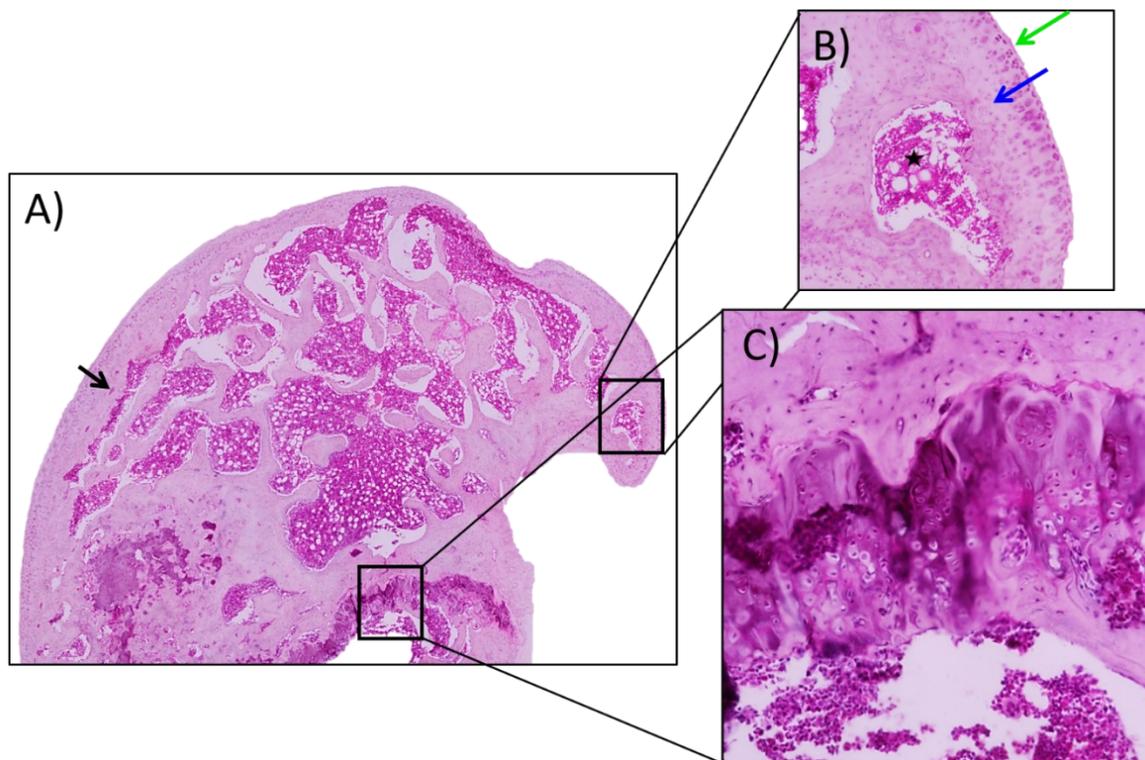


Fig. 23 B) y hay una mayor cantidad de cartilago (ver

Fig. 23 C).



Fig. 23. A) Muestra teñida con H&E de la epífisis proximal del fémur del grupo OVX, tomada a 10x; B) Acercamiento a 20x de la superficie externa del fémur, donde: verde: periostio, azul: endostio, ★: médula ósea; C) Acercamiento a 20x del disco epifisario, observando el crecimiento cartilaginoso. Se observa que el espacio trabecular (inciso A) es más amplio que en una rata OLD (Figura 24 A), se nota mucho más delgado el periostio y el endostio en la superficie externa del hueso en una rata OVX que en el de la muestra OLD.

En las muestras de fémur del grupo OLD, se observó un mayor número de trabéculas. En la zona del hueso compacto, se encuentran pocos espacios vasculares (flecha negra), mientras que el periostio (flecha azul) y el endostio (flecha verde) es más ancho (ver Fig. 24 B), existe poca proliferación de cartílago (ver Fig. 24 C).

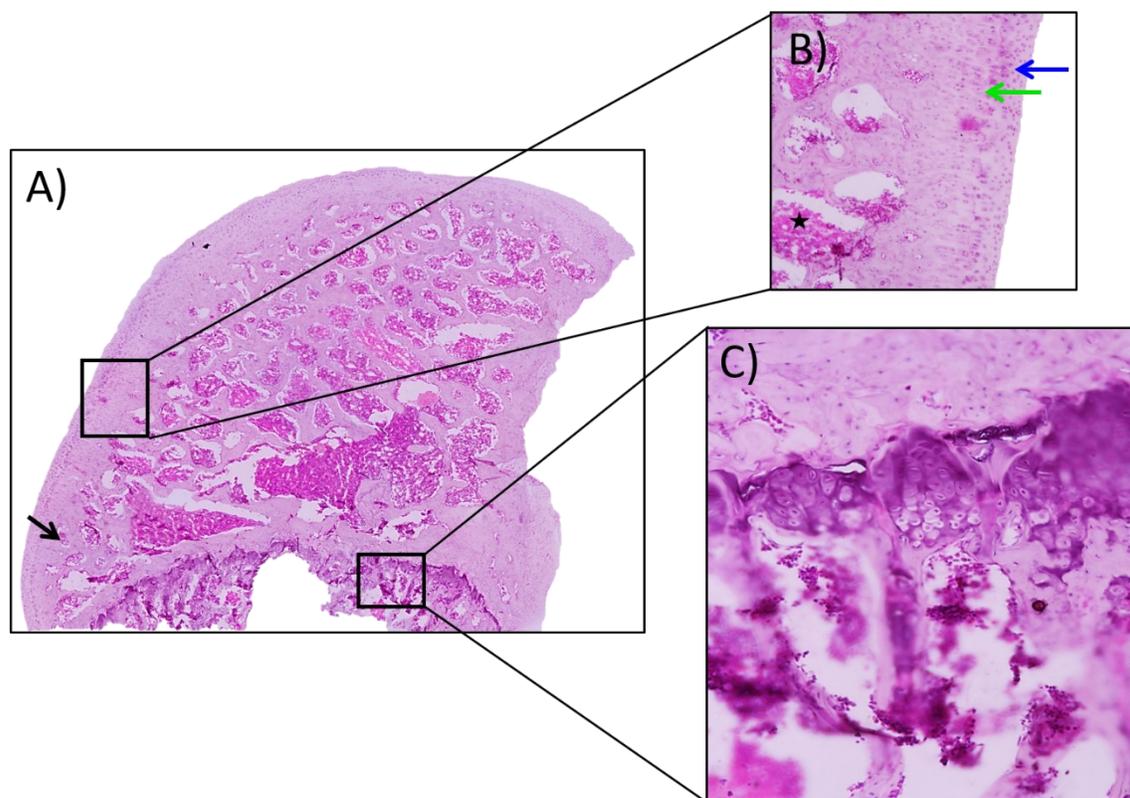


Fig. 24. A) Muestra teñida con H&E de la epífisis proximal del fémur del grupo OLD, tomada a 10x; B) Acercamiento a 20x de la superficie externa del fémur, donde: azul: periostio, verde: endostio, ★: médula ósea; C) Acercamiento a 20x del disco epifisiario, observando el crecimiento cartilaginoso. Se observa que el espacio trabecular (Inciso A) tiene un mayor número de trabéculas respecto a una rata OVX (Figura 23 A).

Observamos que en general, en los huesos del fémur del grupo OVX se observaron espacios trabeculares más amplios en comparación con el grupo OLD. También en el grupo OVX las trabéculas se observaron más delgadas con mayos espacio entre ellas relleno de médula ósea y un hueso cortical más estrecho. También, el espacio del periostio y endostio en la superficie externa del hueso, fue más delgado en el grupo OVX que en el grupo OLD (ver



Fig. 23 y Fig. 24).

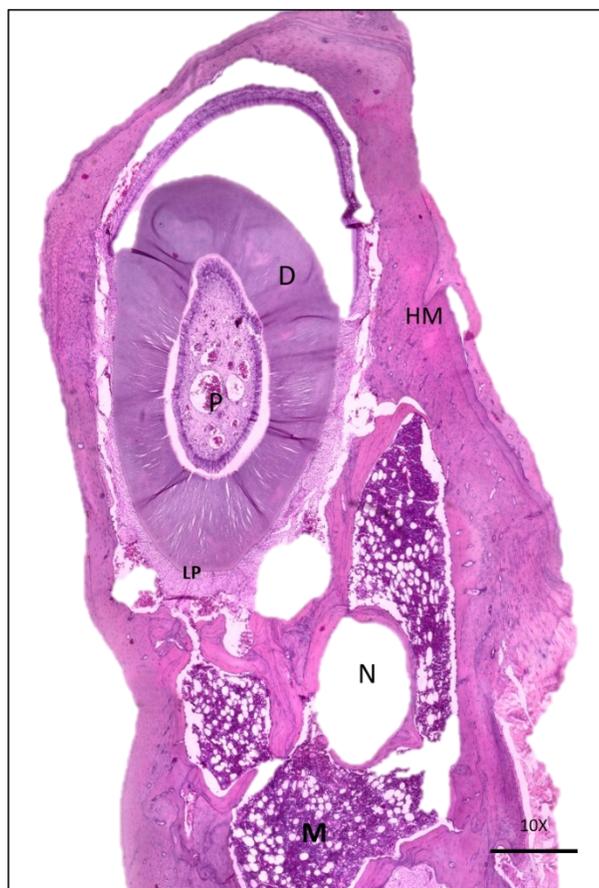


## Histológicos mandibulares

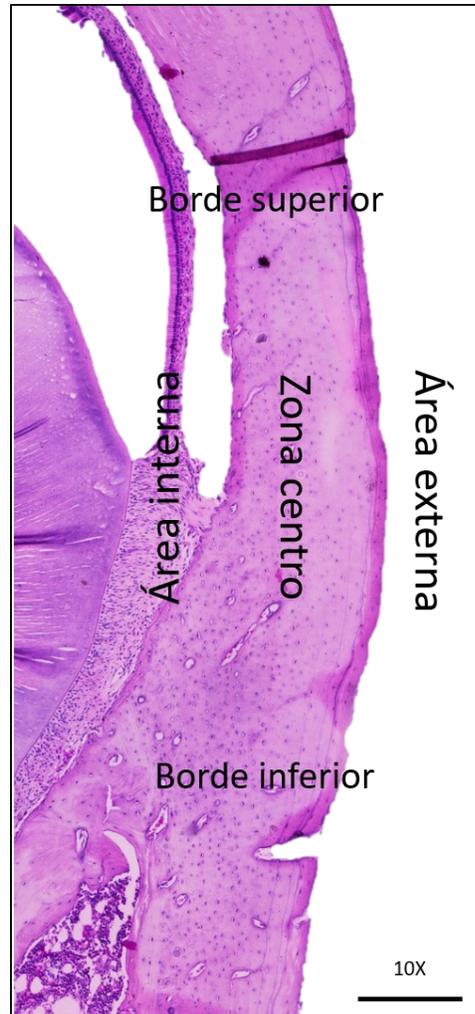
Para la descripción histológica de las muestras mandibulares, se tomó en cuenta lo siguiente:

- **Tejido conectivo:** es el tejido que sostiene, protege y ayuda en la estructura de otros tejidos. También ayuda en el transporte de nutrientes mediante los capilares. Está compuesto por células, fibras y sustancia extracelular abundante.
  - Tejido conectivo laxo: tejido que contiene fibras de colágeno y elastina, contiene abundante matriz extracelular. Histológicamente, podemos observar muchos fibrocitos con núcleos pequeños.
  - Tejido conectivo denso: predominan fibras colágenas sobre la sustancia fundamental amorfa. En este tejido encontramos fibrocitos, encontramos una menor diversidad de tipos celulares.
    - Tejido conectivo regular o modelado: posee una matriz extracelular con gran cantidad de fibras colágenas discurren muy apretadas y orientadas de forma paralela. Podemos encontrarlo en tendones y ligamentos principalmente.
    - Tejido conectivo irregular o no modelado: las fibras colágenas forman redes tridimensionales, son mucho más gruesas y numerosas en comparación con el laxo. Está compuesto principalmente por fibrocitos, histológicamente, solo logra verse el núcleo aplanado relativamente oscuro.

Se realizaron cortes transversales sobre el eje longitudinal a las muestras mandibulares, dividiendo la porción anterior de la posterior (ver Fig. 13). Así, se observaron diferentes estructuras como: diente, pulpa, ligamento periodontal, hueso trabecular y maduro, nervio, y algunos capilares (ver Fig. 25). Las imágenes fueron tomadas a 10x y las zonas de interés a 20x, teñidas con la técnica Hematoxilina-Eosina (H&E).



*Fig. 25. Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una ratona del grupo OVX intacta, tomada a 10x, donde: D: diente, P: pulpa; HM: hueso cortical maduro; LP: ligamento periodontal; N: espacio del nervio; M: médula ósea.*



*Fig. 26. Observamos la zona del defecto con diferentes áreas identificadas sobre él. Muestra teñida con H&E de una mandíbula de rata del grupo OLD intacta, tomada a 10x de la zona del defecto mandibular, en donde se describe: borde superior e inferior, área externa (periostio) y el área interna (ligamento periodontal) y zona centro del defecto.*

## Grupo OVX-SHAM

En todas las muestras, se observó que el defecto no reparó por completo, aunque, existía tejido conectivo que rellenó los defectos y disminuyo con ello, el grosor de la cortical. En la imagen, la zona centro presentó tejido conectivo, al igual que en el área interna, ambas sin evidencia de neoformación ósea. En el área externa, se observó que los bordes del defecto parecían afrontados, aunque sin evidencia de neoformación ósea. En el borde superior, se observó la presencia de vasos sanguíneos (flecha azul) y en el borde inferior, existe tejido conectivo con características de denso regular (flecha roja) y una gran cantidad de células sanguíneas (ver Fig. 27).

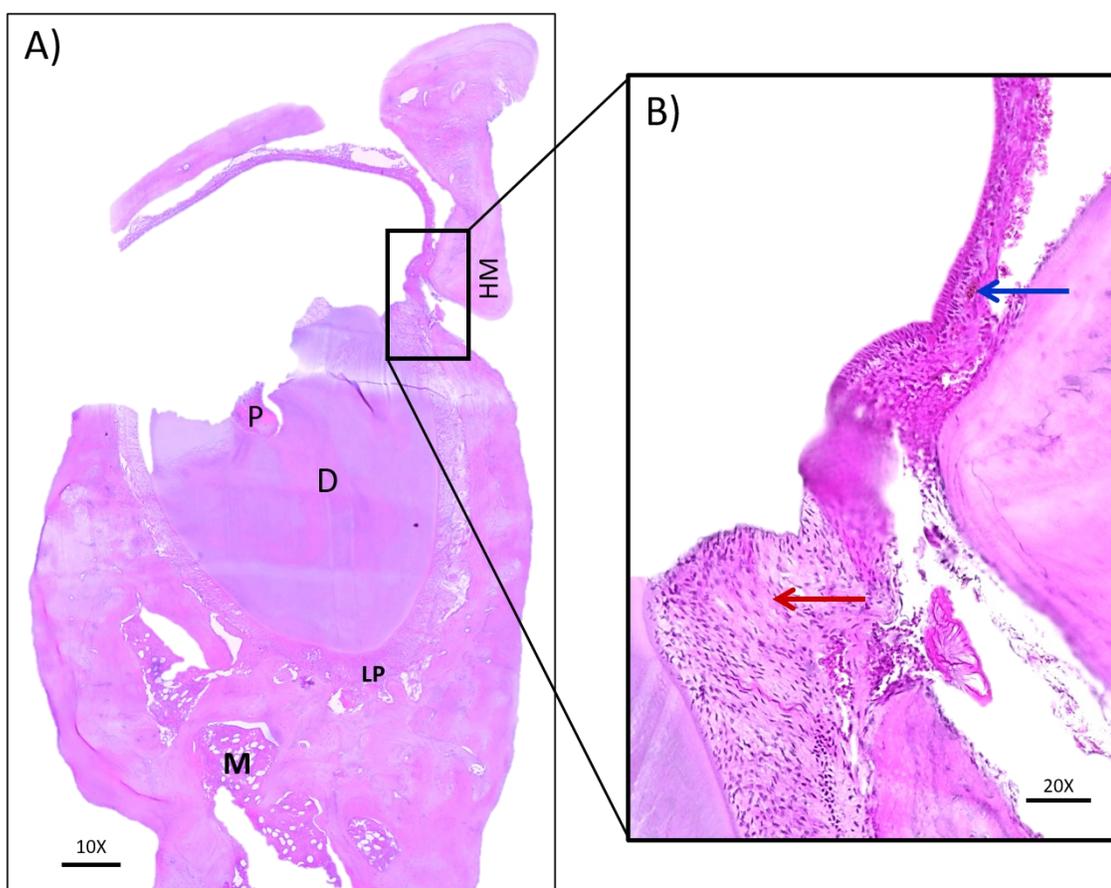


Fig. 27. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata Sham (sin terapia) del grupo OVX-SHAM, 10x, donde: D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, M: médula ósea; B) Acercamiento a 20x de la zona central del defecto. Existe la presencia de vasos sanguíneos y ligamento periodontal (flecha azul) y tejido conectivo denso regular (flecha roja).

## Grupo OVX-PLA

En todas las muestras, se observó que el biomaterial se encontraba aún presente en la zona del defecto y en proceso de sustitución por tejido conectivo irregular, principalmente cerca del área interna. En la zona centro, se observaron las tres capas del biomaterial integrado por tejido conectivo (recuadro naranja). En el área externa, la última capa estaba aparentemente más reabsorbida. En el área interna, se observó una gran cantidad de células, algunas con apariencia de fibroblastos, de células mesenquimales o células linfoides mononucleadas. En el borde superior, existen algunos vasos sanguíneos (flecha azul), tejido con apariencia de osteoide (flecha verde) y presencia de posible neoformación ósea (flecha amarilla). El biomaterial se rodeó de tejido conectivo laxo, y entre cada capa. El defecto comenzó a repararse y la cortical mandibular conservó su volumen (ver Fig. 28).

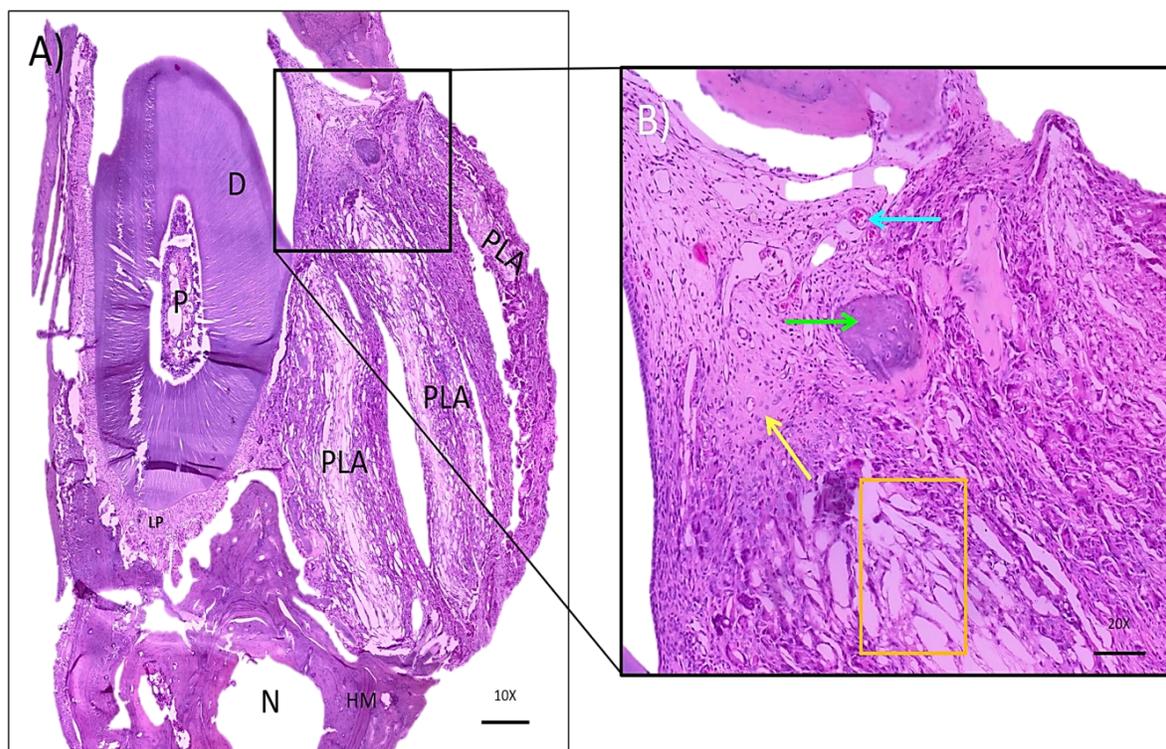


Fig. 28. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una ratas con terapia de PLA del grupo OVX-PLA, 10x, donde: D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, N: espacio del nervio, PLA: ácido poli-láctico; B) Acercamiento a 20x de la zona superior del defecto. Se observa la presencia de vasos sanguíneos en el borde superior, inferior y el área externa del defecto (flecha azul), tejido organizado con apariencia de osteoide en el área interna del defecto (flecha verde) y posible neoformación ósea (flecha amarilla). En el biomaterial se infiltró tejido conectivo laxo (recuadro naranja).

## Grupo OLD-PLA

En todas las muestras, el biomaterial rellenó los defectos y se encontraba en proceso de sustitución, por tejido conectivo laxo y tejido osteoide, no en todas las muestras fue posible observar las tres capas del biomaterial. En la imagen, la zona centro, existe posible neoformación ósea (flecha verde). Se observaron células gigantes multinucleadas en el área interna y externa del defecto (flecha amarilla y azul). En el borde superior e inferior (el recuadro naranja) se observaron algunos vasos sanguíneos, células mononucleares y células con apariencia fibroblastoide. El biomaterial, mantuvo su estructura original y ayudo a rellenar efectivamente los defectos, aunque, el defecto no estaba reparado en su totalidad (ver Fig. 29).

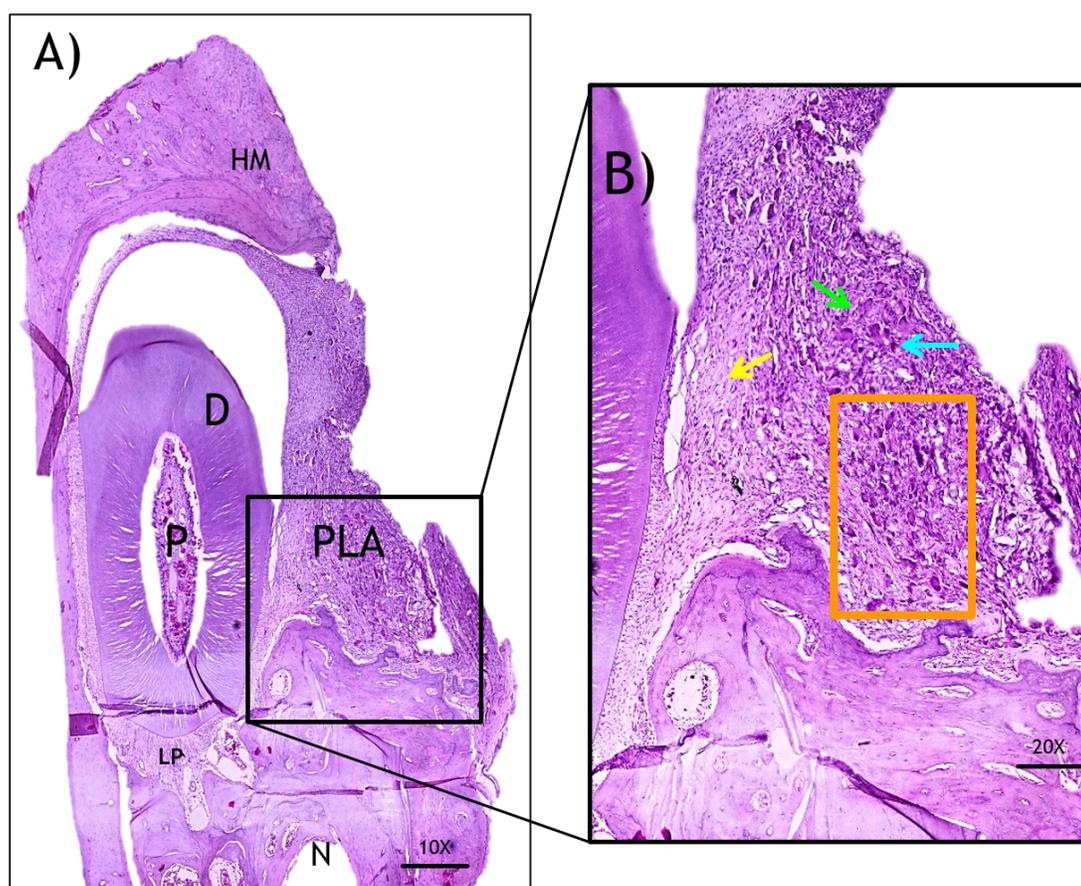


Fig. 29. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula del grupo OLD-PLA, a 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, N: espacio del nervio, PLA: ácido poli-láctico; B) Acercamiento a 20x de la zona inferior del defecto. Se observó la posible neoformación ósea en la zona centro del defecto (flecha verde). Se aprecian células mononucleadas, gigantes multinucleadas y células con apariencia de fibroblastos en el área interna y externa del defecto (flecha amarilla y azul). Se observa el tejido conectivo infiltrando el biomaterial (recuadro naranja).

## Grupo OVX-MSCat

En todas las muestras, se observó neoformación ósea en la periferia del defecto con gran número de células con núcleos centrales alrededor de la zona del defecto. En la imagen, sobre la zona centro, hay presencia de posible tejido conectivo con células mononucleares y alargadas similares a los fibroblastos. En el área interna, el ligamento periodontal mantuvo una apariencia normal y zonas de neoformación ósea (flecha verde). En el borde superior e inferior del defecto, se observaron vasos sanguíneos y gran número de células de tejido conectivo (flecha azul). El defecto no se encontraba totalmente reparado (ver Fig. 30).

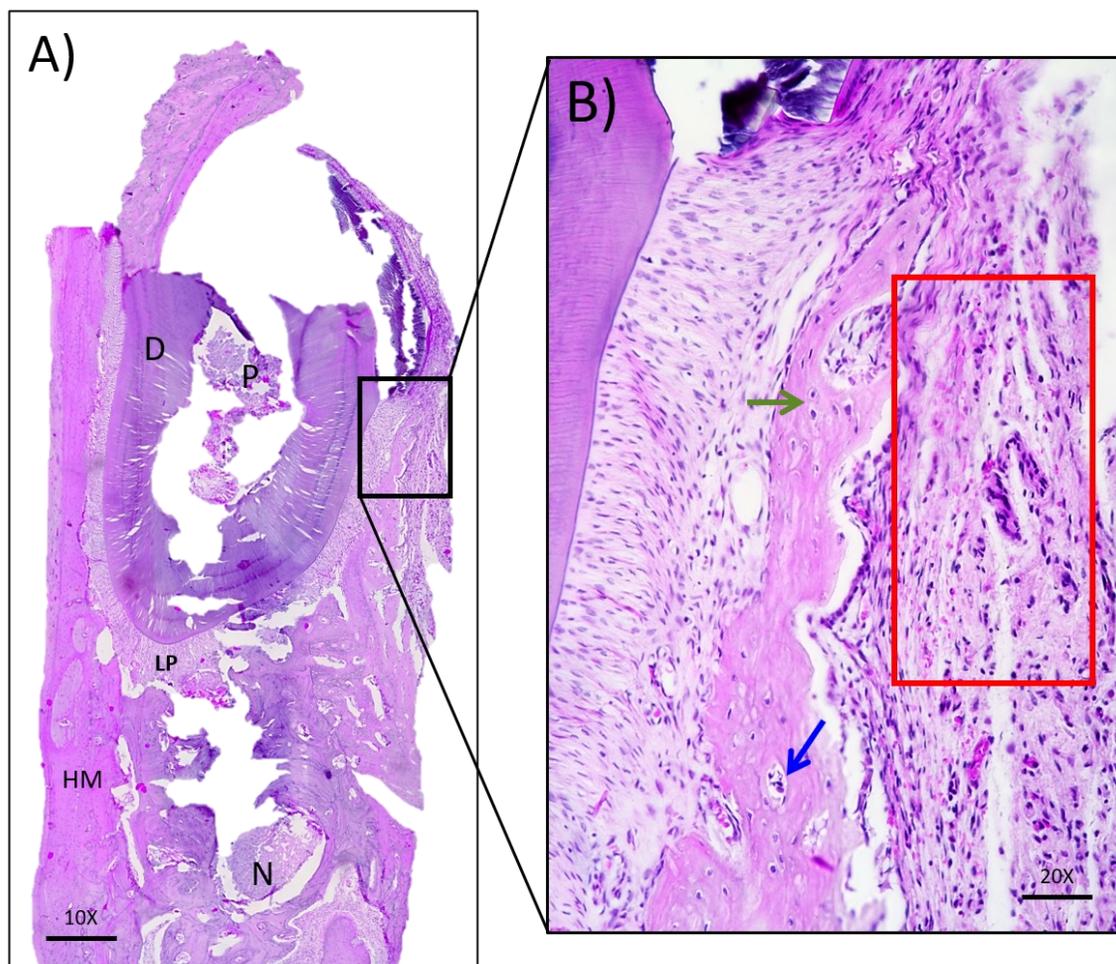


Fig. 30. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula del grupo OVX-MSCat, a 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, N: espacio del nervio; B) Acercamiento a 20x de la zona inferior del defecto. Se aprecian algunos vasos sanguíneos (flecha azul) y tejido conectivo, con abundantes células mononucleares y con apariencia fibroblastoide (recuadro rojo), neoformación ósea (flecha verde).

## Grupo OLD-MSCat

En todas las muestras, se encontró presencia tejido conectivo regular y de vasos sanguíneos, así como hueso neoforado cerrando los defectos, pero con un grosor disminuido de la cortical ósea. En la imagen, la zona centro perdió la continuidad, sin embargo, en el área interna, se observa tejido conectivo con células mononucleadas. Los bordes superior e inferior del defecto, se observó tejido conectivo con abundante matriz extracelular y pocas células mononucleadas. En algunos casos, en los límites del defecto, se observó tejido osteoide o neoforado con una apariencia más organizada, visto de afuera hacia adentro. Aunque el defecto no se reparó completamente, aparenta que los bordes se acercaron con reparación de afuera hacia adentro (ver Fig. 31).

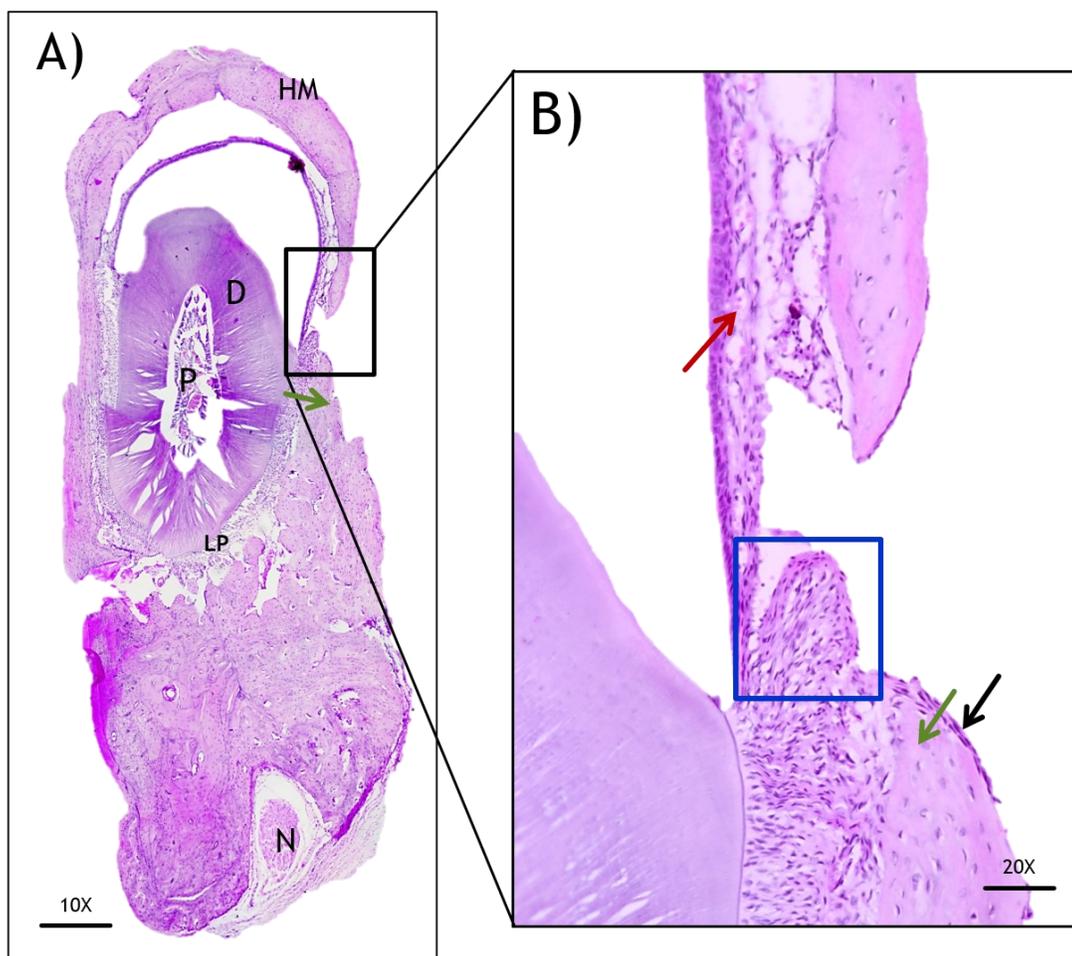


Fig. 31. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula del grupo OLD-MSCat, 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, N: espacio del nervio; B) Acercamiento a 20x de la zona centro del defecto. Se observan células mononucleares en el borde superior (flecha roja) y tejido conectivo en el borde inferior del defecto (recuadro azul), neoformación ósea (flecha verde) y periostio (flecha negra) en la zona externa del defecto.

## Grupo OVX-MSCost

En todas las muestras, se observó que la zona centro del defecto presento tejido conectivo con características de denso. En la imagen, se observó un aumento de volumen, lo que sugiere una reparación/regeneración excesiva en cuando a los límites del defecto, al igual que, un aumento en el número de células que conservan sus características normales. En la zona centro, fue posible observar tejido con características de osteoide, que se pigmento con un color más rosa (flecha roja), y células similares a osteocitos, con forma de lagunas osteocitarias vacías (flecha verde) en su interior. En el área interna y externa, se observó gran cantidad de células mononucleares. En el borde superior e inferior del defecto, se notaron algunos vasos sanguíneos, al igual que gran cantidad de células linfoides y de apariencia fibroblastoide, haciendo evidente en donde comenzaba el tejido óseo maduro. En este grupo, se logró ver que el defecto reparó de buena forma, totalmente relleno con neoformación ósea en forma de lagunas (ver Fig. 32).

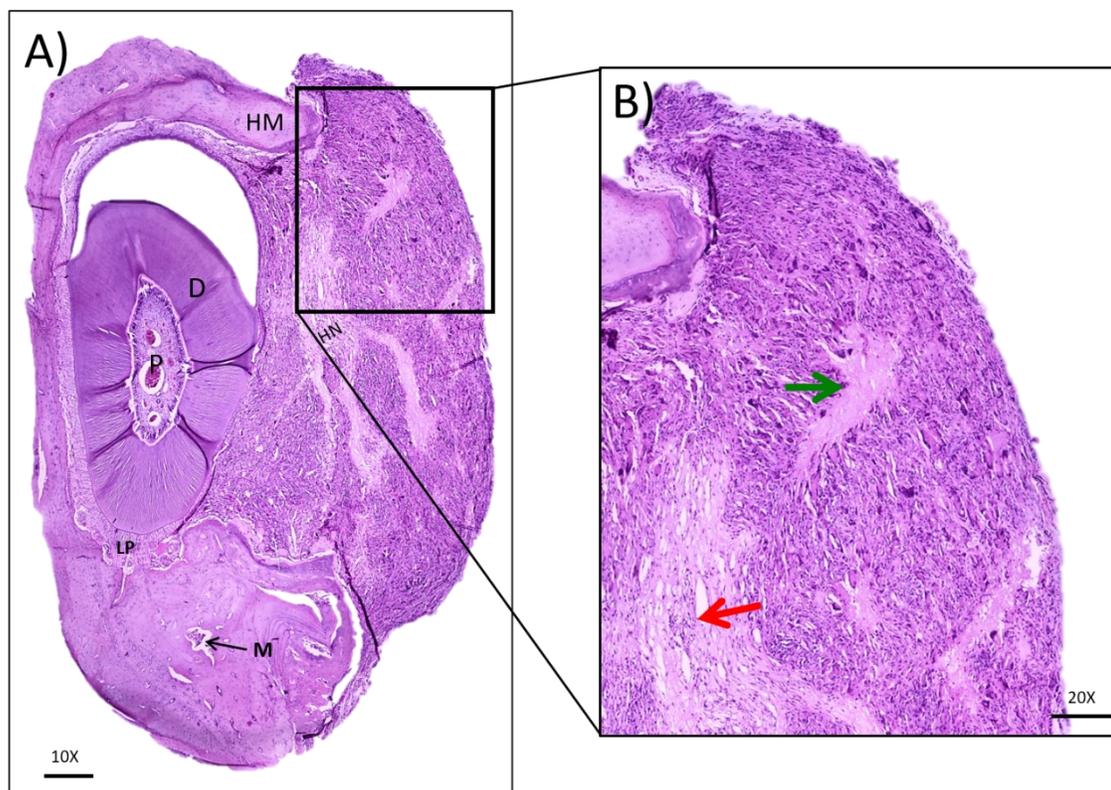


Fig. 32. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula del grupo OVX-MSCost, 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, N: espacio del nervio, HN: hueso nuevo (neoformado), M: médula ósea; B) Acercamiento a 20x de la zona superior del defecto. Sobre la zona centro del defecto, fue posible observar tejido con características de osteoide, que se pigmento menos, con un color más rosa (flecha roja), y que presento en su interior células similares a osteocitos, en algunos casos con forma de lagunas osteocitarias vacías (flecha verde).

## Grupo OLD-MSCost

En todas las muestras, en la zona centro, se observó presencia de tejido conectivo con características de denso irregular y tejido osteoide. En la imagen, los bordes del defecto cerraron con presencia de tejido óseo, tanto hueso viejo de los bordes hacia el centro, como tejido con características de osteoide del centro hacia afuera, con lagunas osteocitarias dentro del defecto (en la zona centro). Se observa el ligamento periodontal y tejido conectivo con un gran número de células con apariencia de fibroblastos tanto en el área interna y externa que rellenan el defecto. En casi todas las muestras de este grupo se observó el cierre del defecto, los bordes se observaron más cercanos, con un cierre de afuera hacia dentro (ver Fig. 33).

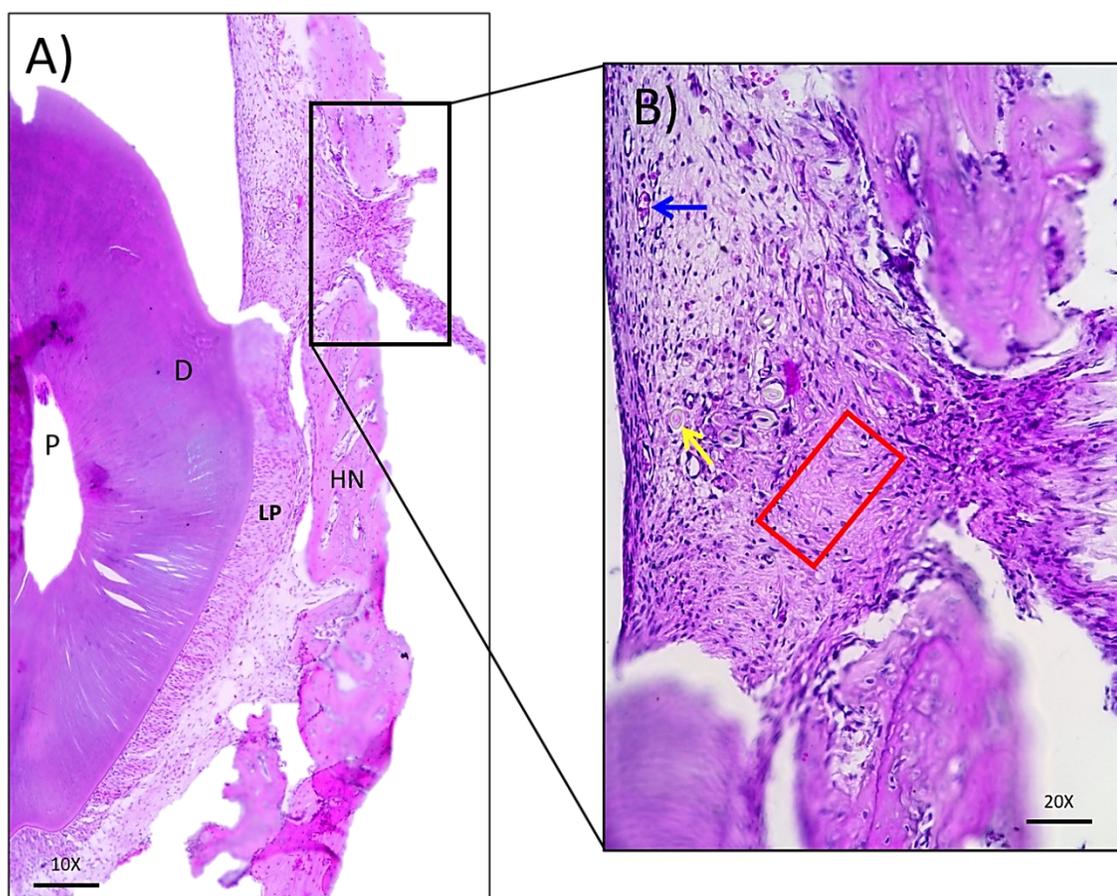


Fig. 33. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una ratita con terapia de MSCost del grupo OLD, tomada a 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, B) Acercamiento a 20x de la zona central del defecto. En el borde superior, se observan vasos sanguíneos (flecha azul), en la parte interna del defecto, presenciamos restos de material extraño en la zona centro del defecto (flecha amarilla) al igual que, posible tejido osteoide (recuadro rojo).

## Grupo OVX-PLA+MSCat

En todas las muestras, se observó un ensanchamiento de la cortical mandibular, al igual que presencia de tejido conectivo con características de regular, con el material rellenando por completo el defecto y sin sobrepasar sus límites. En la imagen, en la zona centro, se observa el PLA, pero únicamente dos capas, la tercera, no es claramente distinguible entre el tejido conectivo regular. Se observaron áreas muy pequeñas de tejido con características de osteoide (se observó teñido de un color más rosa) (flechas azules). En el área interna, el ligamento periodontal se conservó delgado y sin evidencia de inflamación. En el área externa, el tejido conectivo y neoformado no sobrepasaron los límites del defecto. En los bordes superior e inferior del defecto, se observó claramente delimitado el hueso previo, que formaba las paredes del defecto. El defecto se rellenó del biomaterial en proceso de reabsorción infiltrado por tejido conectivo con lagunas de tejido osteoide (ver Fig. 34).

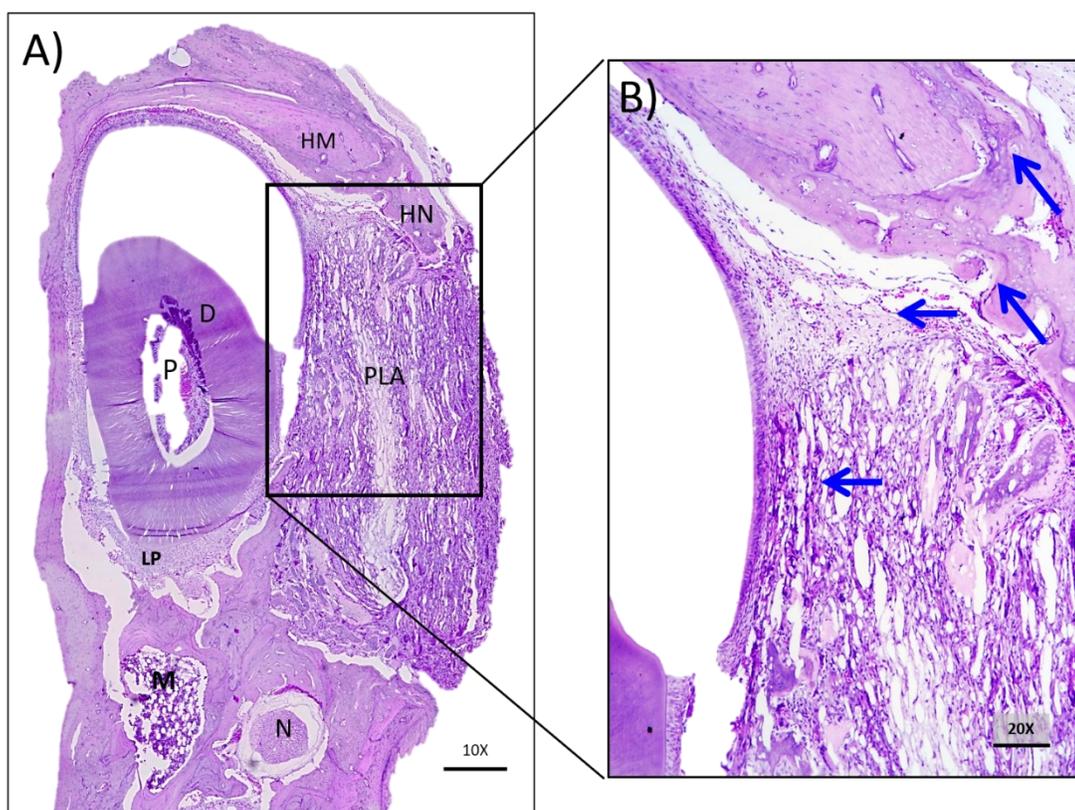


Fig. 34. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula del grupo OVX-PLA+MSCat, 10x, donde D: diente, P: pulpa; HM: hueso cortical maduro; LP: ligamento periodontal; N: espacio del nervio; PLA: ácido poli-láctico; M: médula ósea; B) Acercamiento a 20x de la zona central superior del defecto. En el interior del defecto observamos degradación del PLA en las zonas superior e inferior, externa e interna, y neoformación ósea (flechas azules).

## Grupo OLD-PLA+MSCat

En todas las muestras, el biomaterial se integró prácticamente por completo, además, se dificulta la localización de biomaterial remanente, ya que, posiblemente, se encontraba en proceso de degradación integrado con el tejido conectivo y son células que proliferaron en él y se conservó el grosor de la cortical ósea. En la imagen, se notó una disminución del tamaño del defecto, en la zona centro, se observó tejido conectivo denso organizado (recuadro rojo). En el área interna, el ligamento periodontal no presentó inflamación. En el borde superior, el tejido óseo remanente que conservó la anchura de la cortical. Hacia el borde inferior, se nota reunión de células gigantes conformadas por macrófagos (flechas azules) y tejido conectivo (recuadro rojo) hacia el área externa. Los defectos se observaron rellenos y con tejido conectivo en su interior con gran cantidad de células (ver Fig. 35).

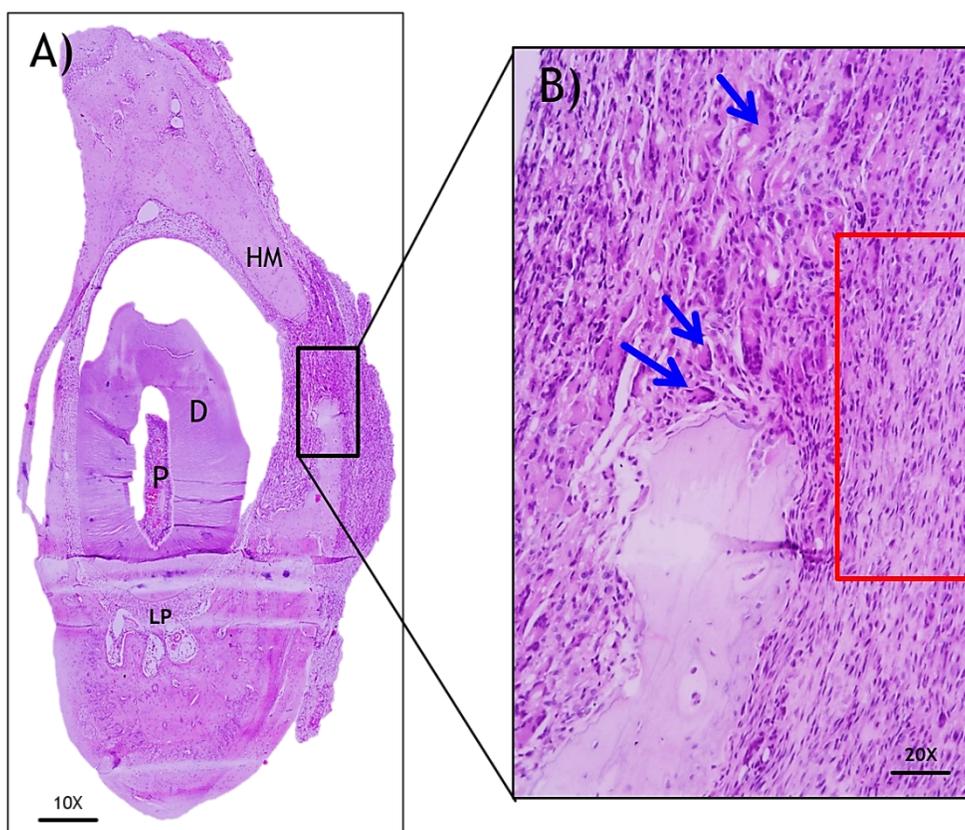


Fig. 35. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula del grupo OLD- PLA+MSCat, 10x, donde D: diente, P: pulpa; HM: hueso cortical maduro; LP: ligamento periodontal; N: espacio del nervio; PLA: ácido poli-láctico; M: médula ósea; B) Acercamiento a 20x de la zona superior del defecto. Hacia el borde inferior, se nota reunión de células gigantes conformadas por macrófagos (flechas azules) y tejido conectivo (recuadro rojo) hacia el área externa.

## Grupo OVX-PLA+MSCost

En este grupo los defectos no se observaron claramente delimitados ya que se observó el cierre de los mismos con una cortical más delgada. En la imagen, el tejido óseo cerró el defecto desde el área externa hasta la zona centro de donde estaba el defecto, es hueso neoformado con osteocitos dentro de sus lagunas osteocitarias y vasos sanguíneos, sin embargo, el grosor de la cortical no mantuvo la misma anchura (línea punteada amarilla). En el área interna, el ligamento periodontal contiene una mayor cantidad de matriz extracelular, con presencia de apariencia fibroblastoide. En el área externa, el hueso neoformado, se rodeó de tejido conectivo en la superficie, lo que sería el periostio (recuadro rojo). En los bordes superior e inferior, se observan los límites del hueso viejo y nuevo, más evidente en el borde inferior (ver Fig. 36).

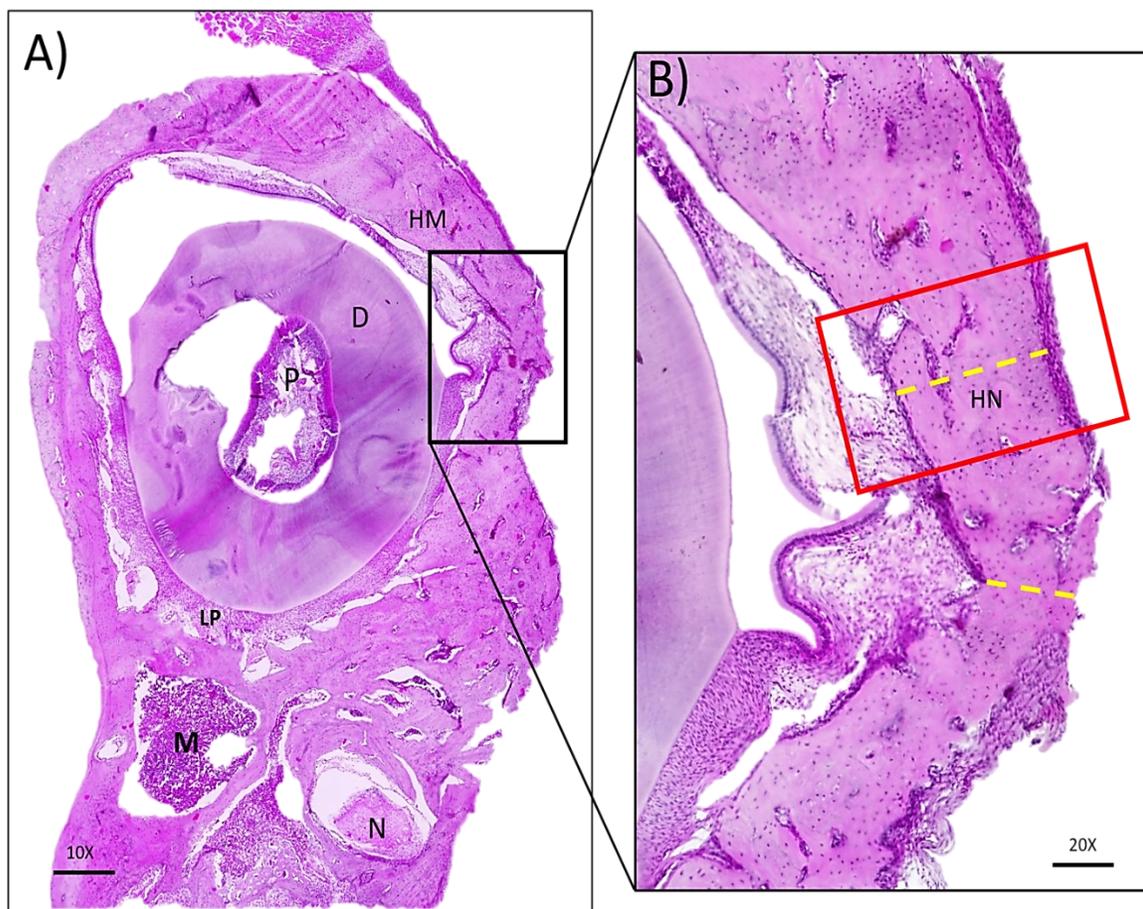


Fig. 36. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula del grupo OVX-PLA+MSCOST, 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, N: espacio del nervio, M: médula ósea, HN B) Acercamiento a 20x de la zona central del defecto. Se observa una zona de regeneración ósea (recuadro rojo), y presencia de tejido conectivo en la zona interna y externa del defecto (línea punteada amarilla).

## Grupo OLD-PLA+MSCost

En todas las muestras se observó sobrecrecimiento de tejido por afuera de los bordes del defecto que se realizó. En la zona centro del defecto, no se observaron claramente las capas del PLA (flecha amarilla) ya que estas se integraron y fueron colonizadas por tejido conectivo, se observó tejido óseo nuevo, en forma de red en el centro del defecto y en el centro del biomaterial, este tejido óseo nuevo con la tinción se observó más rosa, el crecimiento de tejido óseo nuevo parece ser de adentro hacia afuera con numerosas lagunas osteocitarias, algunas vacías (aparentemente) (flecha roja) y claramente diferente del hueso remanente de los bordes superior e inferior del defecto. Por otro lado, en el área interna, se visualiza el ligamento periodontal con apariencia normal y de tejido conectivo y en el área externa, se observó sobrecrecimiento de aparente tejido conectivo con gran número de células mononucleadas con forma fibroblastoide (recuadro azul). En el borde superior se observó mejor el límite del defecto con hueso antiguo y en los bordes inferiores no siempre se observó de forma clara (ver Fig. 37).

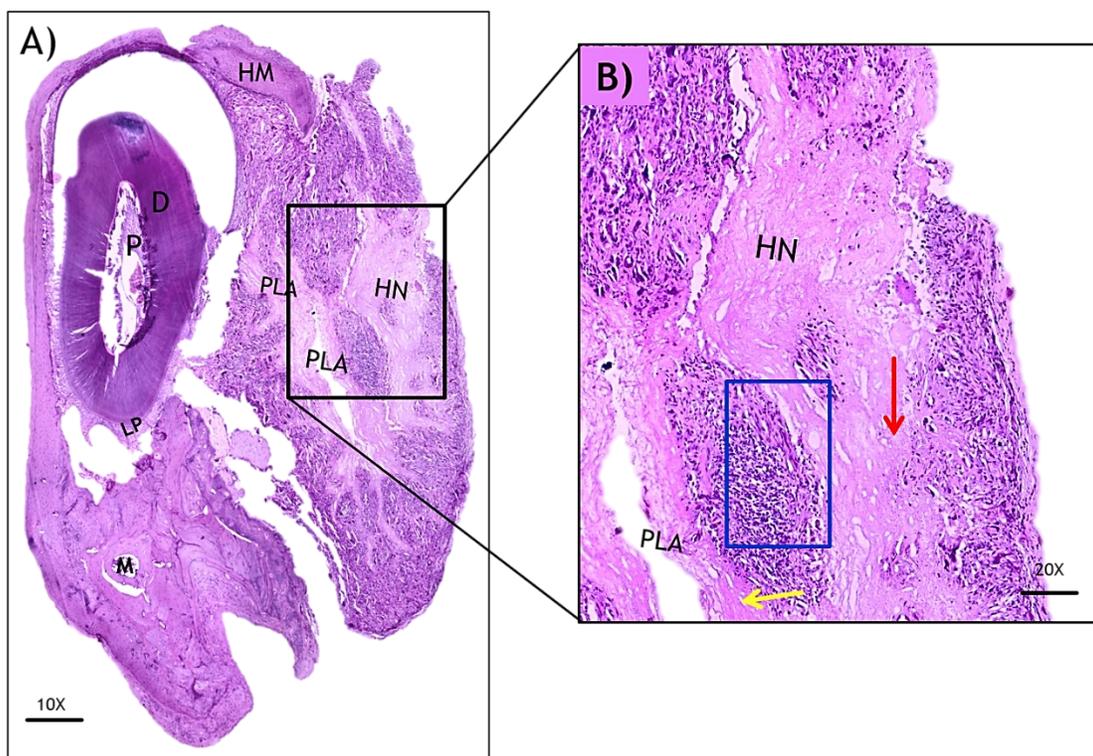


Fig. 37. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula del grupo OLD- PLA+MSCost, 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, PLA: ácido poli-láctico, M: médula ósea, B) Acercamiento a 20x de la zona central del defecto. Se observa que el PLA (flecha amarilla) está siendo reemplazado por tejido conectivo en la zona central del defecto (recuadro azul) y en el área externa del defecto, neoformación ósea (flecha roja).



## DISCUSIÓN

Actualmente, la MR es un campo de investigación amplio que, en conjunto con la IT, nos ofrece nuevas terapias para la reparación/regeneración de tejidos, a partir de la utilización de MSC y biomateriales. Estas disciplinas en conjunto, nos permiten ofrecer nuevas opciones de tratamiento a los pacientes, ya que día a día, aumenta el número de pacientes con Op, afectando los huesos y en especial al tejido óseo mandibular, es importante probar la eficacia de estas nuevas terapias en modelos animales (Hendrijanti, 2019) (Taguchi, 1996).

Los dentistas tienen un papel importante en el diagnóstico temprano de la Op, debido a que, uno de los medios de diagnóstico más utilizados son las radiografías panorámicas, en las que se puede observar claramente los cambios en el tejido óseo, sobre todo, en el hueso mandibular (Tounta, 2017) (Khojastepour, 2019).

En este trabajo, se utilizó un modelo de Op inducido mediante OVX en el que se realizó un defecto crítico en mandíbula, previamente estandarizado (Trejo-Iriarte, 2019) y que se realizó con el fin de evaluar la capacidad para promover la regeneración ósea de un constructo de PLA y MSCost.

El modelo de rata OVX es un modelo preclínico confiable y aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Thompson D. D., 1995). Como grupo control, se emplearon ratas envejecidas a la par que el modelo (grupo OLD). En todos los grupos empleamos a las ratas en etapa “sexualmente madura”, es decir, empleamos ratas *Wistar* hembra de más de 3 meses de edad (Sengupta P., 2013).

Después de 5 meses (150 días aprox.) posteriores a las OVX, se observaron cambios radiográficamente visibles en la cortical ósea, tanto en la mandíbula, como en la tibia. 8 meses post-OVX (240 días/ 32 semanas) hubo cambios notables en el peso corporal y alteraciones en la concentración de  $Ca^{+}$  en sangre (disminución); datos que coinciden con los reportados por Brem y cols. en 2004 (Brem, 2004), quienes también emplearon hembras *Wistar* de 3 meses de edad y notaron cambios desde el 6° mes (180 días aprox.), como disminución de la cortical ósea, aumentos significativos de peso y alteraciones en la concentración de  $Ca^{+}$  en sangre (disminución).



Existen estudios que no reportaron cambios en la cortical mandibular en ratas OVX, pero se debió principalmente, a que el tiempo que usaron que fue de 12 semanas o menor post-OVX (Sengupta S, 2005). (Leitner MM, 2009). En el caso del modelo OLD, se utilizaron ratas sanas que envejecieron al mismo tiempo y aunque aumentaron de peso y tuvieron cambios en la concentración de  $Ca^{+}$  en sangre (disminución), son datos que cuando fueron comparados con del grupo OVX fueron mucho menores.

En los resultados histológicos, en el grupo OVX, los espacios trabeculares se observaron más amplios y con mayor proporción de espacios con medula ósea, en comparación con el grupo OLD, que presentó mayor grosor del hueso cortical y con osteocitos distribuidos de manera regular en el tejido, lo que es congruente, con lo reportado en estudios previos, que han demostrado esta diferencia en la estructura ósea mediante CT, y cuyos principales hallazgos fueron que, después de 9 semanas post-OVX hay un volumen óseo alveolar reducido y una separación trabecular aumentada (Tanaka M., 2002.) (Irie K., 2004.), por lo que, la estabilidad del hueso alveolar que soporta directamente los molares se ve comprometida (Ames, 2010). Para este estudio, fue importante que se observaran estos cambios trabeculares, así como la disminución en el grosor cortical y que con esto se pudiera comprobar que el procedimiento de OVX fue adecuado para desarrollar la Op, y que está si afecta al hueso al mandibular.

En otro estudio (Yang, 2005) reportaron que en las ratas que estudiaron a 52 semanas después de la OVX (13.5 meses) observaron un menor grosor cortical mandibular; y también un mayor espacio del ligamento periodontal, de igual forma, en ésta tesis, se observó un menor grosor en la cortical y el espacio del ligamento periodontal más ensanchado en el grupo OVX, en comparación con el grupo OLD.

En el caso del biomaterial, empleamos PLA al 10% hecho mediante la técnica de electrohilado, que fue previamente probado por Granados-Hernández y cols (Granados, 2017) quienes demostraron su alta biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo*; cuando sembraron en él células mesenquimales de la médula ósea, las cuáles aumentaron su proliferación a partir del día 7 al 21, por ello, en esta tesis se eligió sembrar y cultivar las MSCat y MSCost sobre el PLA hilado durante 14 días antes de injertarlo en los defectos mandibulares.



En otro estudio Granados-Hernández y cols (Granados-Hernández MV, 2018) publicaron que tanto *in vitro* como *in vivo*, el biomaterial tarda en degradarse más de 100 días, lo que lo hace ideal para aplicarlo como injerto en defectos óseos. En esta tesis, se comprobó que el PLA al 10% demostró ser buen andamio para las células, además de contar con buenas propiedades mecánicas y de porosidad y que se degradó adecuadamente, dando sitio al hueso nuevo (Hao W. D., 2010).

En este grupo de investigación, se ha trabajado ampliamente con el PLA, Aceves en 2018 (Aceves, 2018) lo probó injertándolo en tejido subcutáneo a 6 y 12 semanas destacando que, el biomaterial se integró convenientemente. De forma semejante, Martínez (Martínez F. J., 2017) y Aguilar (Aguilar, 2020) lo probaron en defectos óseos mandibulares, en uni-capas y tricapas respectivamente. Por lo que, en la presente tesis decidimos usarlo en tricapa, reportando que en los grupos con PLA (OLD-PLA y OVX-PLA) el biomaterial se integró adecuadamente, además de mantenerse en los límites del defecto, además, se notó neoformación ósea en la zona central del defecto, lo que sugiere que, usarlo en tricapa es adecuado y la reparación ósea mejora con respecto al grupo sham.

Respecto a los grupos en donde se empleó la terapia MSCat y MSCost, el uso de las células mesenquimales para promover la regeneración ósea ha sido probado previamente (Storti, 2019) (Barba M, 2017) (Trejo Iriarte, 2010). Se sabe que las MSC tienen capacidad de regenerar los tejidos y además, funcionan como reclutadoras, también se les ha atribuido que poseen efectos antiinflamatorios sistémicos específicos por las citocinas liberadas después de fracturas óseas (Wang X, 2013), también cuando se han empleado MSC alogénicas se ha observado que reducen la incidencia de la enfermedad de injerto contra huésped y modulan la inflamación (Aggarwal, 2005) (Wen C, 2016), algo que también se observó en este trabajo, puesto que, en los defectos no observamos inflamación en los tejidos que rellenaban los defectos. Además, se ha reportado que cuando se trata de MSCat en términos de senescencia celular y rendimiento del aislamiento celular, no hay afectaciones por la edad del donante, aunque en este estudio, se emplearon células alogénicas provenientes de ratas jóvenes y sanas (Dufrane, 2017).



En los grupos OVX-MSCat y OLD-MSCat se observó regeneración de tejido, en su mayoría tejido conectivo organizado, lo que mantuvo la integridad del tejido. En ambos casos, se observó gran número de células de apariencia fibroblastoide, y en ninguno había inflamación, por lo que se cree que las capacidades inmunomoduladoras y antiinflamatorias que tanto se han reportado, hacen posible esta regeneración de tejido en los defectos realizados.

En cuanto al uso de las MSCost, que son las MSCat osteo-diferenciadas, se ha demostrado que mejoran la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico y parecen acelerar la recuperación en fracturas óseas (Garg, 2017), (Jo, 2017) (Qi, 2016). Por otro lado, se ha reportado que las células mesenquimales de tejido adiposo alogénicas diferenciadas al linaje osteogénico, podrían promover la regeneración ósea cuando son sembradas en andamios (Wen C, 2016) (Yoshida, 2019) (Peel Kim, 2012).

En los grupos OLD-MSCost y OVX-MSCost, se observó formación de tejido conectivo denso dentro del defecto y lagunas de tejido osteoide; sin embargo, en el grupo OLD-MSCost se observó un sobrecrecimiento celular. En cuanto los grupos con terapia MSCost, PLA+MSCost demostraron una mejor respuesta hacia la regeneración ósea, tanto en el grupo OLD, como en el OVX. En los grupos OVX y OLD PLA+MSCat/MSCost, se notó la presencia de tejido conectivo con características de denso y lagunas de tejido óseo nuevo.

En los estudios publicados (Hao W. D., 2010) (Shahrezaee, 2018) de implantes de biomateriales en forma de membrana sembrados con células mesenquimales diferenciadas, emplean el injerto en una capa, pero parece que en muchos casos no es suficiente, por ello, en esta tesis, se decidió emplear el biomaterial en tricapa, ya que, se tomó en cuenta que en este caso, se trataba de especímenes con Op o con envejecimiento, por lo que, se esperaba una recuperación ralentizada; sin embargo, en los resultados, se observó un sobrecrecimiento de tejido en el grupo OLD-PLA+MSCost, por fuera de los límites del defecto, lo que indica que, probablemente no es necesario hacer una tricapa del biomaterial sembrado y con una capa del PLA sería suficiente.

Se ha demostrado previamente que la combinación de PLA y células mesenquimales pre-inducidas en medio osteogénico da como resultado una neoformación ósea e integración del PLA (Hao W. D., 2010) (Wang, 2016). En esta tesis, también se presentó neoformación ósea en los grupos de PLA+MSCat y PLA+MSCost en ambos grupos (OVX y OLD) y de forma general, los grupos Sham/control no rellenaron el defecto.



## CONCLUSIONES

El modelo de Osteoporosis es eficaz, y cuanto más tiempo transcurre desde la OVX, mayor es la magnitud de los cambios observados en la estructura ósea alveolar y cortical mandibular.

El PLA como andamio cito y biocompatible, logró fungir como una buena red de distribución para las células y para conservar el grosor de la cortical mandibular.

En cuanto a las terapias celulares, ambas regeneraron los defectos. Con la terapia MSCost en el grupo OVX el defecto se rellenó totalmente con tejido óseo, y en el grupo OLD cerro con tejido osteoide.

En los constructos, tanto en PLA+MSCat como en PLA+MSCost se observó una mejor integración y regeneración. La diferencia es, que el grupo MSCost requiere 15 días más (*in vitro*, previo a ser implantado).

Con esto, se demuestra que el uso de los constructos compuestos por PLA y Células Mesenquimales alogénicas derivadas de tejido adiposo, diferenciadas o no al linaje óseo son una prometedora estrategia terapéutica para la reparación de defectos óseos, en la Osteoporosis.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aceves, A. L. (2018). *Citocompatibilidad de in constructo de Ingeniería de Tejidos elaborado con PLA y Células Troncales*. Tlalnepantla, Estado de México: Iztacala.
- Aggarwal, S. &. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.*, 105(4), 1815-1822. doi:doi:10.1182/blood-2004-04-1559
- Aguilar, M. A. (2020). *Regeneración ósea mandibular con constructos elaborados mediante ingeniería de tejidos*. Tlalnepantla de Baz, Estado de México.: Iztacala.
- Almazán, A. (Mayo-Junio. de 1996). Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colagena 1 polimerizada: Estudio radiológico, histológico e histoquímico. *Revista Mexicana de Ortopedia y Traumatología.*, 10.(3.), 142-152.
- Ames, H. S.-G. (2010). Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. *Archives of Oral Biology.*, 55(8), 599-605. doi:doi:10.1016/j.archoralbio.2010.0
- Barba M, D. T. (2017). Adipose-derived stem cell therapies for bone regeneration. *Expert Opin Biol Ther.*, 17(6), 677-689. doi:doi:10.1080/14712598.2017.1315403
- Barrales Uribe, A. (2018). *Título: Estudio histológico del implante de un biovidrio en un modelo de defecto crítico en mandíbula de rata. Tesis que para obtener el título de Licenciado en Cirujano Dentista*. Facultad de Estudios Superiores Iztacala : Universidad Nacional Autónoma de México.
- Boccaccio, A. B. (2011). Finite Element Method (FEM), Mechanobiology and Biomimetic Scaffolds in Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biological Sciences.*, 7(1), 112–132. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3030147/>
- Brem, J. (2004). Osteoporosis experimental en ratas ovariectomizadas: densitometría ósea y concentración de minerales en sangre y cenizas de hueso. *Revista Veterinaria Argentina*, 15(2), 56-61. Obtenido de <https://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/view/2000>
- Chen, L.-R. (2019). Medical Treatment for Osteoporosis: From Molecular to Clinical Opinions. *International Journal of Molecular Sciences*, 1-21. doi:10.3390/ijms20092213
- Diagnóstico y Tratamiento Diagnóstico y Tratamiento de Osteoporosis en mujeres pos de Osteoporosis en mujeres pos de Osteoporosis en mujeres posmenopáusicas menopáusicas menopáusicas. . (2013). *Guía de Práctica Clínica*, 8. Recuperado el 17 de Agosto de 2018, de IMSS: <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/673GER.pdf>
- Diomedes, F. G. (2018). Three-dimensional printed PLA scaffold and human gingival stem cell-derived extracellular vesicles: a new tool for bone defect repair. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 104. doi:doi:10.1186/s13287-018-0850-0



- Dufrane, D. (2017). Impact of age on human adipose stem cells for bone tissue engineering. *Cell transplantation*, 26(9), 1496-1504.
- Farah Shady, A. D. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications-A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 367-392. doi:10.1016/j.addr.2016.06.012
- Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I. A. (Enero-Febrero de 2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 11(1), 47-51.
- Flores-Figueroa, E. M. (2006). Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de investigación clínica*, 58(5), 498-511. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0034-83762006000500011&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0034-83762006000500011&script=sci_arttext)
- Garg, P. M. (2017). Prospective review of mesenchymal stem cells differentiation into osteoblasts. *Orthopaedic surgery*, 13-19.
- Garrido F., G. I. (2003). *Procedimientos Básicos para el Laboratorio de Apoyo y Diagnóstico*. México: UNAM.
- Gimble, J. K.-1. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research*, 100(9), 1249-1260. doi:doi.org/10.1161/01
- Granados, M. M.-M.-P. (2017). Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de médula ósea en andamios fibrilares de poli (ácido L-láctico) (PLA). *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica.*, 38(1), 288-296. doi:<https://dx.doi.org/10.17488/rmib.38.1.24>
- Granados-Hernández MV, S.-B. J. (2018). In vitro and in vivo biological characterization of poly(lactic acid) fiber scaffolds synthesized by air jet spinning. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 106(6), 2435-2446. doi:doi:10.1002/jbm.b.34053
- Guercio, E. (1999). LA OSTEOPOROSIS. SUS EFECTOS SOBRE LA CAVIDAD BUCAL. *Acta Odontológica Venezolana*, 37(2), -. Obtenido de [https://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/2/osteoporosis\\_efectos\\_cavidad\\_bucal.asp#top](https://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/2/osteoporosis_efectos_cavidad_bucal.asp#top)
- Guerrero, F. (Sep-Dic de 2016). ). Uso de la matriz derivada del esmalte (Emdogain®) combinada con hidroxiapatita bovina (Nukbone®) y barrera con esponja de colágeno polivinilpirrolidona (Fibroquel®) en cirugía periapical: reporte de un caso clínico. *Oral*, 55(17), 1412-1417. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2016/ora1655f.pdf>
- Gutiérrez Gómez, J. (2008). El proceso de remodelación ósea. *Medigraphic. Artemisa en línea.* , 4(3), 170-176. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/orthotips/ot-2008/ot083d.pdf>
- Hao, W. D. (2010). Enhanced bone formation in large segmental radial defects by combining adipose-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 2 with nHA/RHLC/PLA scaffold. *International orthopaedics*, 34(8), 1341-1349.



- Hao, W. H. (2008). Collagen I gel can facilitate homogenous bone formation of adipose-derived stem cells in PLGA- $\beta$ -TCP scaffold. *Cells Tissues Organs*, 187(2), 89-102. doi:10.1159/000109946
- Harrison, T. (2006). *Principios de Medicina Interna* (16 ed.). (Interamericana, Ed.) McGraw-Hill.
- Hendrijanti, N. R. (2019). The effect of low-level estrogen in mandibular bone: An in vivo study. *Dental research journal.*, 16(2), 65–70. doi:PMID: 30820198
- Hermoso de Mendoza, M. (2003). Clasificación de la osteoporosis: Factores de riesgo. Clínica y diagnóstico diferencial. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra.*, 29-52. Obtenido de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272003000600004&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000600004&lng=es&tlng=es).
- Hyun Byung, Z. L. (2012). Enhancement of tibial regeneration in a rat model by adipose-derived stromal cells in a PLGA scaffold. *Bone*, 51(3), 313-323. doi:10.1016/j.bone.2012.05.019
- Ibañez, R. (2012). Ingeniería Tisular en Odontología. *Asociación Dental Mexicana.*, 69(4), 164-167. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2012/od124d.pdf>
- IMSS. (2013). Diagnóstico y Tratamiento de Osteoporosis en mujeres posmenopáusicas menopáusicas. *Guía de Práctica Clínica*, 8. Recuperado el 17 de Agosto de 2018, de IMSS: <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/673GER.pdf>
- IMSS. (2018). Evidencias, recomendaciones, diagnóstico y tratamiento de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. *Guía de Practica Clínica*, 1-83. Obtenido de <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/673GER.pdf>
- Irie K., S. Y. (2004.). Three-dimensional changes of the mandible and alveolar bone in the ovariectomized rat examined by micro-focus computed tomography. *Journal of the Japanese Society of Periodontology.*, 4(4), 288-293. doi:doi: 10.2329/perio.46.288.
- Ji, M. y. (2015). Primary osteoporosis in postmenopausal women. *Chronic diseases and translational medicine.*, 1(1), 9-13. doi:doi: 10.1016 / j.cdtm.2015.02.006
- Jo, K. K. (2017). Effect of canine cortical bone demineralization on osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Heliyon*.
- Kapinas, K. D. (2011). MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Research and Therapy*. doi:doi:10.1186/ar3325
- Khojastepour, L. H. (2019). Mandibular Trabecular Bone Analysis Using Local Binary Pattern for Osteoporosis Diagnosis. . *Journal of Biomedical Physics & Engineering.*, 9(1), 81–88. doi:PMID: 30881937
- Leitner MM, T. A. (2009). Longitudinal as well as age-matched assessments of bone changes in the mature ovariectomized rat model. *Lab Anim.*, 43(3), 266-271. doi:doi:10.1258/la.2008.008045
- Lendeckel, S., Jödicke, A., Christophis, P., Heidinger, K., Wolff, J., Fraser, J. K., . . . Berthold, L. &. (2004). Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat



- widespread traumatic calvarial defects: case report. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, 32(6), 370-373.
- Liao, H. T. (2014). Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World journal of stem cells*, 6(3), 288-295. doi:<https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.288>
- Li-Ru, C. K.-Y.-H. (2019). Medical Treatment for Osteoporosis: From Molecular to Clinical. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2213), 1-21. doi:10.3390/ijms20092213
- Liu, H. J. (2018). Liu, H., Jiao, Y., Zhou, W., Bai, S., Feng, Z., Dong, Y., Liu, Q., Feng, X., ... Zhao, Y. (2018). Endothelial progenitor cells improve the therapeutic effect of mesenchymal stem cell sheets on irradiated bone defect repair in a rat model. *Journal of translational medicine*, 16(1), 137. doi:10.1186/s12967-018-1517-4
- Martínez, F. J. (2017). *Utilización de polímeros de ácido poliláctico (PLA) como tratamiento en defectos óseos mandibulares en un modelo experimental con ratas*. Tlalnepantla de Baz, Estado de México: Iztacala.
- Martínez, F. J. (2017). *Utilización de polímeros de ácido poliláctico (PLA) como tratamiento en defectos óseos mandibulares en un modelo experimental con ratas*. Estado de México: UNAM.
- Meruane, & Rojas, M. (2010). Adipose Tissue Derived Stem Cells. *International Journal of Morphology.*, 28(3), 879-889. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022010000300035>
- Meruane, M. &. (2010). Adipose Tissue Derived Stem Cells. *International Journal of Morphology*, 28(3), 879-889. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022010000300035>
- Mesimäki, K., Lindroos, B., Törnwall, J., Mauno, J., Lindqvist, C., Kontio, R., & Miettinen, S. &. (2009). Maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. . *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 201-209.
- Miana, V. V. (2018). Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *Ecancermedicalscience*, 822. doi:<https://doi.org/10.3332/ecancer.2018.822>
- Moataz A., J.-W. P.-H. (2017). Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews-*, 79, 1346-1352. doi:[dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.143](https://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.143)
- Mohamed-Ahmed, S. F. (2018). Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem cell research & therapy.*, 9(1). doi:10.1186/s13287-018-0914-1
- Molina, O. (2017). Aumento de Reborde Alveolar utilizando Bloques de Aloinjerto de Cresta Iliaca (Reporte de Caso). *Tesis*, 1-13.
- Morales Navarro, D. (2014). Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología. *Revista Cubana de Estomatología.*, 51(3), 288-304. Recuperado el



2018 de Agosto de 14, de  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75072014000300006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072014000300006)

Navarro, C. (2008). *Cirugía Oral*. Madrid, España: Arán. Obtenido de  
<https://books.google.com.mx/books?id=1KFL9FqMgMYC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=true>

Neyro Bilbao, J. &.-A. (2011). Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. . *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral.*, 3(2), 105-112. Obtenido de <https://www.redalyc.org/html/3609/360933652006/>

Olaiz-Fernández, G. R.-S. (2007). Diabetes mellitus en adultos mexicanos: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Salud pública de México*, 49, s331-s337.

Parenteau, N. (1999). Skin: the first tissue-engineered products. . *Scientific American*, 280(4), 83-85.

Parrales Pincay, K. R. (2018). Preservación del alveolo post-exodoncia mediante el uso de sulfato de calcio (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad Piloto de Odontología.

Peel Kim, H. J. (2012). Enhancement of bone regeneration using osteogenic-induced adipose-derived stem cells combined with demineralized bone matrix in a rat critically-sized calvarial defect model. . *Current stem cell research & therapy.*, 165-172.

Pérez Cano, R. (2002). Osteoporosis: concepto, clasificación, fisiopatología clínica. *Protocolos de Medicina Interna.*, 21-41. Obtenido de [https://www.fesemi.org/sites/default/files/documentos/publicaciones/capitulo-2\\_0.pdf](https://www.fesemi.org/sites/default/files/documentos/publicaciones/capitulo-2_0.pdf)

Pineda Molina, C. &. (2009.). OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE DEL TEJIDO ADIPOSO Y SU POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICO/ADIPOSE TISSUE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS, ISOLATION AND DIFFERENTIATION INTO THE OSTEOGENIC LINEAGE. *Revista Ingeniería Biomédica.*, 3(5), 58-65. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1909-97622009000100010&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-97622009000100010&lng=en&tlng=es).

Qi, X. Z. (2016). Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells repair critical-sized bone defects through enhanced angiogenesis and osteogenesis in osteoporotic rats. *International journal of biological sciences*.

Raspall, G. (2006). *Cirugía oral e implantología*. Madrid, España: Panamericana. Obtenido de <https://books.google.com.mx/books?id=CNzlos2loHAC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=true>

Renner RP, B. L. (1984). Osteoporosis in postmenopausal women. *J Prosthet Dent*, 581-588.



- Revati, M. A. (2015). Biodegradable Poly (Lactic Acid) Scaffold for Tissue Engineering: A brief review. *Journal of Polymer Science and Technology*, 1(1), 16-24. doi:10.1016/j.procir.2015.07.025
- Rincón-Sierra, O. (2007). Patogénesis de la Osteoporosis: Papel de los estrógenos. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 58(2), 141-149. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v58n2/v58n2a08.pdf>
- Sengupta P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International journal of preventive medicine.*, 4(6), 624–630. doi:PMID: 23930179
- Sengupta S, A. M. (2005). Attainment of peak bone mass and bone turnover rate in relation to estrous cycle, pregnancy and lactation in colony-bred Sprague-Dawley rats: suitability for studies on pathophysiology of bone and therapeutic measures for its management. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 94(5), 421-429. doi:doi:10.1016/j.jsbmb.2004.12.039
- Serna L, A. F. (2011). Ácido poliláctico (PLA): Propiedades y aplicaciones. *Ingeniería y competitividad.*, 5.(1.), 16-26.
- Sesman-Bernal, A. L. (Septiembre-Octubre de 2007). Actualidades en regeneración y remodelación ósea craneal. Revisión de la literatura. *Acta Pediátrica de México.*, 28(5), 183-192. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/actpedmex/apm-2007/apm075d.pdf>
- Shahrezaee, M. S. (2018). In vitro and in vivo investigation of PLA/PCL scaffold coated with metformin-loaded gelatin nanocarriers in regeneration of critical-sized bone defects. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.*, 2061-2073.
- Storti, G. S. (2019). Adipose-Derived Stem Cells in Bone Tissue Engineering: Useful Tools with New Applications. *Stem cells international*. doi:<https://doi.org/10.1155/2019/3673857>
- Suchý Tomáš, B. M. (2018). MICRO-CT IN TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS DESIGNED FOR BONE REGENERATION: PRINCIPLES AND APPLICATION. *Ceramics-Silikáty*, 62(2), 194-199. doi:doi: 10.13168/cs.2017.0012
- Taguchi, Y. S. (1996). Usefulness of panoramic radiography in the diagnosis of postmenopausal osteoporosis in women. Width and morphology of inferior cortex of the mandible. *Dentomaxillofacial Radiology*, 263-267.
- Tajbakhsh. (2017). A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly(lactic acid)/ceramics for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 897-912. doi:10.1016/j.msec.2016.09.008.
- Tanaka M., E. S. (2002.). Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *Journal of Periodontal Research.*, 37(2), 161-165. doi:doi: 10.1034/j.1600-0765.2002.01601.x.
- Thompson D. D., S. H. (1995). FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.*, 17, S125-S133.



- Tounta, S. T. (2017). Diagnosis of osteoporosis in dental patients. *Journal of frailty, sarcopenia and falls*, 2(2), 21–27. doi:PMID: 32300679
- Trejo Iriarte, C. G. (2010). *Terapia celular para la reparación ósea de la cavidad bucal. Modelo experimental de defecto mandibular*. Alalá, España.: Universidad de Alcalá.
- Trejo-Iriarte, C.-B.-E.-M.-H.-V. (2019). Evaluation of bone regeneration in a critical size cortical bone defect in rat mandible using microCT and histological analysis. *Archives of Oral Biology.*, 165-171. doi:10.1016/j.archoralbio.2019.01.010
- Wang X, W. Y. (2013). Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop.*, 37(12), 2491-2498. doi:doi:10.1007/s00264-013-2059-2
- Wang, X. X. (2016). Restoration of a Critical Mandibular Bone Defect Using Human Alveolar Bone-Derived Stem Cells and Porous Nano-HA/Collagen/PLA Scaffold. *Stem Cells International*, 3. doi:http://doi.org/10.1155/2016/8741641
- Wen C, Y. H. (2016). Allogeneic adipose-derived stem cells regenerate bone in a critical-sized ulna segmental defect. *Exp Biol Med (Maywood).*, 241(13), 1401-1409. doi:doi:10.1177/1535370215576298
- Wu, S. X. (2018). La evaluación de BMP-2 mejora la diferenciación de los osteoblastos de las células madre mesenquimáticas de amnios humanos sembradas en nano-hidroxiapatita / colágeno / poli (l-lactida). *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, (8)(19), 2171. doi:10.3390
- Xiao, L. W. (2012). Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. *Biomedical Science, Engineering and Technology*, 247-282. doi:10.5772/23927
- Yang, F. D. (2005). The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. *Journal of Dentistry.*, 123-129. doi:doi: 10.1016/j.jdent.2004.09.001.
- Ye, X. Z. (2014). Adipose-derived stem cells alleviate osteoporosis by enhancing osteogenesis and inhibiting adipogenesis in a rabbit model. *Cytotherapy*, 16(12), 1643–1655. doi:https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.07.009
- Yoshida, Y. M. (2019). Adipose-derived stem cell sheets accelerate bone healing in rat femoral defects. *PloS one*.
- Zeynep Busra Velioglu, D. P. (2018). 3D-printed poly(lactic acid) scaffolds for trabecular bone repair and regeneration: scaffold and native bone characterization. *Connective Tissue Research*, 1-9. doi:https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1499732
- Zuk, P. A. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell.*, 13(12), 4279–4295.
- Zuluaga, F. (. (2013.). ALGUNAS APLICACIONES DEL ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.*, 37(142), 125-142. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pi](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pi)



## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Tabla de medición de DMO, según la OMS.</i>	10
<i>Tabla 2. Agentes farmacológicos aprobados para la prevención de la osteoporosis posmenopáusica.</i>	13
<i>Tabla 3. Agentes farmacológicos aprobados para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica.</i>	13
<i>Tabla 4. Tabla de los grupos OVX y OLD.</i>	29
<i>Tabla 5. Proceso de descalcificación de muestras para su inclusión.</i>	84
<i>Tabla 6. Proceso de tinción con Hematoxilina y Eosina (H&amp;E) de las muestras de mandíbulas descalcificadas</i>	85

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<i>Gráfica 1. Gráfica para la comparación de peso entre OVX y OLD. Donde *** <math>p &lt; 0.0001</math></i>	44
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

# ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema que representa el proceso de remodelación ósea, en el que se observa la función de los osteoclastos, de las células mesenquimales que se inducen a pre-osteoblastos, posteriormente se modifican a osteoblastos y forman así osteocitos, que ayudan en el proceso de mineralización *Modificado al idioma español (Kapinas, 2011) .	8
Fig. 2. Esquema del proceso de electrohilado del PLA en forma vertical, donde observamos la jeringa con el polímero que es expulsado mediante una aguja y gracias a una fuente de alto voltaje de 2 electrodos (uno a la salida de la solución y otro al plato recolector (lámina de metal) donde serán depositadas las fibras posteriores a la evaporación del disolvente. *Modificado al idioma español (Revati R, 2015).	17
Fig. 3. Proceso de realización de un andamio.	18
Fig. 4. Cultivo de células MSCat a las 2 semanas.	20
Fig. 5. Cultivo de células MSCost a los 14 días post diferenciación	20
Fig. 6. Procedimiento de Ovariectomía. La flecha señala la luz de la trompa de Falopio; por el otro lado, el círculo señala el otro ovario.	30
Fig. 7. Extracción de tejido adiposo; A) Proceso de extracción, B) Muestra de tejido adiposo.	32
Fig. 8. A) Disgregación mecánica del tejido adiposo; B) La flecha señala el pellet, posterior a la centrifugación.	33
Fig. 9. Imagen de la cámara de Neubauer: A) es el grabado de la cámara (hematocitómetro) en la que, para nuestras células, se cuentan los cuadrados marcados con rojo. B) Solo contamos las células vivas, que se observan brillantes que no hayan sido teñidas por azul de tripán. C) Esquema del recuento de los campos dentro de los cuadrantes (los del margen rojo).	34
Fig. 10. A) Medidas del diseño de defecto quirúrgico; B) Defecto al que se le coloca terapia celular; C) Defecto al que se le coloca PLA.	36
Fig. 11. Fotografía del procedimiento de obtención de la muestra de sangre, en el momento de la punción intracardiaca.	38
Fig. 12. Estudio en espectrofotómetro; A) Preparación de la cubeta con el reactivo, B) Cubeta colocada para la lectura.	38
Fig. 13. Fotografía del momento en el que se realizó la sección mandibular sobre el eje longitudinal (separando porción anterior de posterior).	40
Fig. 14. A) Radiografías de miembro inferior derecho de rata; a) Radiografía inicial del grupo OVX, se observa la epífisis distal del fémur, el disco articular y la meseta tibial, b) Radiografía final del grupo OVX, se observa la cabeza y diáfisis del peroné y tibia, c) Radiografía inicial del grupo OLD, se observa la epífisis distal del fémur, el disco articular y la meseta tibial, d) Radiografía final del grupo OLD, se observa diáfisis de peroné y tibia. B) Radiografía de la mandíbula de rata; a) Radiografía inicial del grupo OVX, se observan los incisivos y molares, b) Radiografía final del grupo OVX, se observan los incisivos y molares, c) Radiografía inicial del grupo OLD, se observa incisivos y molares, cuerpo mandibular y parte del ángulo, d) Radiografía final del grupo OLD, se observa incisivos y molares y parte del cuerpo mandibular.	43
Fig. 15. Estructuras anatómicas de la mandíbula. Muestra del grupo OVX con terapia de PLA+MSCat.	46
Fig. 16. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD intacta; B) Muestra del grupo OVX intacta.	47
Fig. 17. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD con terapia de PLA; B) Muestra del grupo OVX con terapia de PLA.	47
Fig. 18. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD con terapia de PLA+MSCat; B) muestra del grupo OVX con terapia de PLA+MSCat.	47
Fig. 19. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD con terapia de PLA+MSCost; B) Muestra del grupo OVX con terapia de PLA+MSCost.	48



- Fig. 20. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD con terapia de MSCat; B) Muestra del grupo OVX con terapia de MSCat. \_\_\_\_\_ 48
- Fig. 21. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD con terapia de MSCost; B) Muestra del grupo OVX con terapia de MSCost. \_\_\_\_\_ 49
- Fig. 22. Foto macroscópica: A) Muestra del grupo OLD Sham; B) Muestra del grupo OVX Sham. \_\_\_\_\_ 49
- Fig. 23. A) Muestra teñida con H&E de la epífisis proximal del fémur del grupo OVX, tomada a 10x; B) Acercamiento a 20x de la superficie externa del fémur, donde: verde: periostio, azul: endostio, ★: médula ósea; C) Acercamiento a 20x del disco epifisiario, observando el crecimiento cartilaginoso. observar que el espacio trabecular (inciso A) es más amplio que en una rata OLD (Figura 21, inciso A), notamos también que el espacio del periostio y endostio en la superficie externa del hueso, es mucho más delgado en una rata OVX que en una OLD. \_\_\_\_\_ 51
- Fig. 24. A) Muestra teñida con H&E de la epífisis proximal del fémur del grupo OLD, tomada a 10x; B) Acercamiento a 20x de la superficie externa del fémur, donde: verde: periostio, azul: endostio, ★: médula ósea; C) Acercamiento a 20x del disco epifisiario, observando el crecimiento cartilaginoso. \_\_\_\_\_ 52
- Fig. 25. Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata del grupo OVX intacta tomada a 10x, donde: D: diente, P: pulpa; HM: hueso cortical maduro; LP: ligamento periodontal; N: espacio del nervio; M: médula ósea. Observamos la zona del defecto con diferentes áreas identificadas sobre él, las cuales servirán como guía para poder describir los resultados (ver figura 23). \_\_\_\_\_ 55
- Fig. 26. Muestra teñida con H&E de una mandíbula de rata del grupo OLD intacta, tomada a 10x de la zona del defecto mandibular, delimitando al borde superior e inferior, el área externa (periostio) y el área interna (endostio) y la parte central del defecto. \_\_\_\_\_ 56
- Fig. 27. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata Sham (sin terapia) del grupo OVX, tomada a 10x, donde: D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, M: médula ósea; B) Acercamiento a 20x de la zona central del defecto. Podemos notar la presencia de vasos sanguíneos en la zona superior, inferior y la parte interna del defecto (flecha azul), notamos posible tejido conectivo (flecha roja). \_\_\_\_\_ 57
- Fig. 29. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata con terapia de PLA del grupo OVX, tomada a 10x, donde: D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, N: espacio del nervio, PLA: ácido poli-láctico; B) Acercamiento a 20x de la zona superior del defecto. Podemos notar la presencia de vasos sanguíneos en la zona superior, inferior y la parte interna del defecto (flecha azul), algunas espículas de hueso maduro (flecha verde), a lo largo del defecto observamos aún la presencia del PLA y la presencia de posible neoformación ósea (flecha amarilla). \_\_\_\_\_ 58
- Fig. 30. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata con terapia de PLA del grupo OLD, tomada a 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, N: espacio del nervio, PLA: ácido poli-láctico; B) Acercamiento a 20x de la zona inferior del defecto. Notamos presencia de tejido conectivo a lo largo del defecto (recuadro naranja) y vasos sanguíneos (flecha azul), en la zona central del defecto podemos observar posible neoformación ósea (flecha verde). \_\_\_\_\_ 59
- Fig. 31. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata con terapia de MSCat del grupo OVX, tomada a 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, N: espacio del nervio; B) Acercamiento a 20x de la zona inferior del defecto, se aprecian algunos vasos sanguíneos (flecha azul) y tejido conectivo, cerca del hueso maduro remanente (recuadro rojo). \_\_\_\_\_ 60
- Fig. 32. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata con terapia de MSCat del grupo OLD, tomada a 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, N: espacio del nervio; B) Acercamiento a 20x de la zona centro del defecto, donde podemos observar algunos vasos sanguíneos (flecha roja) y posible tejido conectivo en la zona inferior del defecto (recuadro azul). \_\_\_\_\_ 61
- Fig. 33. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata con terapia de MSCost del grupo OVX, tomada a 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, N: espacio del nervio, HN: hueso nuevo (neoformado), M: médula ósea; B) Acercamiento a 20x de la zona superior del defecto, Se observan algunas células gigantes multinucleadas en la zona interna y externa, además de

posible neoformación ósea (flecha verde). En la parte superior e inferior del defecto observamos la presencia de algunos vasos sanguíneos, al igual que células inflamatorias. En la zona central del defecto encontramos presencia de tejido conectivo. \_\_\_\_\_ 62

Fig. 34. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata con terapia de MSCost del grupo OLD, tomada a 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, B) Acercamiento a 20x de la zona central del defecto. Observamos que tanto en la parte superior como la inferior existe la presencia de vasos sanguíneos (flecha azul), en la parte interna del defecto, presenciamos posibles células óseas (flecha amarilla) y en la zona central se mira posible tejido conectivo (recuadro naranja). \_\_\_\_\_ 63

Fig. 35. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata con terapia de PLA+ MSCOST del grupo OVX, tomada a 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, N: espacio del nervio, M: médula ósea, B) Acercamiento a 20x de la zona central del defecto. Observamos una posible zona de reparación ósea (recuadro rojo), y presencia de tejido conectivo en la zona interna del defecto (flecha amarilla). \_\_\_\_\_ 66

Fig. 36. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata con terapia de PLA+MSCost del grupo OLD, tomada a 10x, donde D: diente, P: pulpa, HM: hueso cortical maduro, LP: ligamento periodontal, PLA: ácido poli-láctico, M: médula ósea, B) Acercamiento a 20x de la zona central del defecto. Notamos que el PLA (flecha amarilla) está siendo reemplazado por tejido conectivo en la zona central del defecto (recuadro azul), en la zona externa del defecto, observamos posible neoformación ósea (flecha verde). \_\_\_\_\_ 67

Fig. 37. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata con terapia de PLA+MSCat del grupo OVX, tomada a 10x, donde D: diente, P: pulpa; HM: hueso cortical maduro; LP: ligamento periodontal; N: espacio del nervio; PLA: ácido poli-láctico; M: médula ósea; B) Acercamiento a 20x de la zona central superior del defecto. A lo largo del defeco observamos degradación del PLA (flecha azul), en las zonas superior e inferior, podemos apreciar posible neoformación ósea. \_\_\_\_\_ 64

Fig. 38. A) Muestra teñida con H&E de una mandíbula de una rata con terapia de PLA+MSCat del grupo OLD, tomada a 10x, donde D: diente, P: pulpa; HM: hueso cortical maduro; LP: ligamento periodontal; N: espacio del nervio; PLA: ácido poli-láctico; M: médula ósea; B) Acercamiento a 20x de la zona superior del defecto. Podemos observar posible neoformación ósea (flecha verde), a lo largo del defecto, el PLA es degradado por células (flecha azul) y existe la presencia de posibles células óseas (recuadro rojo). \_\_\_\_\_ 65



## ANEXOS.

### ANEXO 1

---

*Proceso de deshidratación*

---

Reactivo	Tiempo de radiación (microondas)	Tiempo de reposo	Tiempo total por tipo de alcohol
Alcohol 70%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 70%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 80%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 80%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 96%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 96%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 98%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 98%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 100%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 100%	2 minutos	13 minutos	15 minutos

*Tabla 5. Proceso de descalcificación de muestras para su inclusión.*

Se utilizó Xileno-cloroformo (1:1) como reactivo de enlace, se realizaron dos cambios cada 24 horas, a temperatura ambiente.

Las muestras deshidratadas se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados de 4 µm de espesor.



## ANEXO 2

### *Proceso de tinción con H&E*

Se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) para observar las características morfológicas mediante un microscopio óptico Zeiss (AxioLab.A1 marca Carl Zeiss). Se obtuvieron fotografías de las preparaciones a 10, 20 y 40 aumentos. Se utilizó resina sintética para hacer permanente la muestra y poder observarla en el microscopio.

<b>Reactivo</b>	<b>Tiempo</b>
Xilol	15 minutos
Xilol	15 minutos
Alcohol absoluto	5 minutos
Alcohol absoluto	5 minutos
Alcohol 96%	5 minutos
Alcohol 96%	5 minutos
Alcohol 80%	5 minutos
Alcohol 70%	5 minutos
Agua destilada	Rápido
Hematoxilina	15 minutos
Agua destilada	Rápido
Alcohol ácido	Rápido
Agua corriente	Rápido
Carbonato de Litio 1%/ agua corriente	1 minuto
Agua destilada	Rápido
Eosina Acuosa	15 minutos
Alcohol 96%	5 minutos
Alcohol 96%	5 minutos
Alcohol absoluto	5 minutos
Alcohol absoluto	5 minutos
Xilol	5 minutos
Xilol (Terminar)	5 minutos

Tabla 6. Proceso de tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E) de las muestras de mandíbulas descalcificadas



## ANEXO 3

Requerimientos para la preparación de reactivos para lectura en espectrofotómetro de acuerdo a Ca-Color AA Wiener Lab. ®.

### CONDICIONES DE REACCIÓN

- Longitud de onda: 650 nm en espectrofotómetro o 620-650 nm en fotocolorímetro.
- Temperatura de reacción: temperatura ambiente (15-25°C).
- Tiempo de reacción: 2 minutos
- Volumen de muestra: 10 ul
- Volumen final de reacción: 1,01 ml

Los volúmenes de muestra y reactivo A se pueden variar proporcionalmente (ej.: 20 ul de muestra + 2 ml de Reactivo A o 5 ul de muestra + 0,5 ml de Reactivo A).

	B	S	D
<b>Muestra</b>	-	-	10 ul
<b>Standard o Calibrador</b>	-	10 ul	-
<b>Agua destilada</b>	10 ul	-	-
<b>Reactivo A</b>	1 ml	1 ml	1 ml

Mezclar e incubar 2 minutos a temperatura ambiente (15-25°C). Leer la absorbancia en espectrofotómetro a 650 nm o en fotocolorímetro (620-650 nm), llevando el aparato a cero con el Blanco.

### ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción final es estable 1 hora, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.



## ANEXO 4

---

### Avaes

---



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala  
**COMISIÓN DE ÉTICA**



Los Reyes Iztacala a **19/10/2018**

Oficio: **CE/FESI/102018/1268**

**DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA**

Presente:

En atención a su solicitud de aval, por la Comisión de Ética de esta facultad, para su proyecto denominado **Evaluación de un constructo hecho mediante Ingeniería de Tejidos en un modelo de osteoporosis.**, que va a someter a **AVAL PARA TESIS LIC. MONICA GABRIELA ESTRADA HERNANDEZ (AVALES PREVIO DEL MISMO PROYECTO 1261 Y 1089.**

Esta comisión acordó la siguiente opinión técnica:

**Avalado sin recomendaciones**

Sin otro particular por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración y aprovechamos la oportunidad para enviarle un atento saludo y nuestro respeto académico.

Atentamente

**M. en C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido**  
Presidente





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**  
**Comisión de Bioseguridad**



**DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA**  
**PRESENTE**

Por este medio informo a Usted que su proyecto:

Evaluación de un constructo hecho mediante Ingeniería de Tejidos en un modelo de osteoporosis. TESIS de Licenciatura de la alumna: Monica Gabriela Estrada Hernández que forma parte del proyecto que ya cuenta con los AVALES PREVIOS DE ETICA 1226 Y 1261 Y LOS AVALES DE BIOSEGURIDAD 0035 Y 0085.

que será sometido a la convocatoria: CAAX DE LA CARRERA DE CIRUJANO DENTISTA.

Cumple con los requisitos establecidos por las leyes y normas en materia de Bioseguridad, razón por la cual se avala para su desarrollo.

**POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU**

Los Reyes Iztacala, a los 30 días del mes de octubre del 2018

Biol. MUÑOZ LOPEZ JOSE LUIS  
Presidente

