



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Estudio Sobre la Seguridad del Constructo de
Células Mesenquimales, Fosfato Tricálcico y Matriz
Ósea desmineralizada para Uso Clínico.

D^a. María del Mar Gonzálvez García

2015



Universidad de Murcia

Facultad de Medicina

Tesis Doctoral

Estudio Sobre la Seguridad del Constructo de
Células Mesenquimales, Fosfato Tricálcico y Matriz
Ósea desmineralizada para Uso Clínico

Doctoranda: María del Mar González García

Directores: Prof. Dr. Miguel Ángel Fernandez-Villacañas Marín.
Prof. Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano.



Estudio Sobre la Seguridad del Constructo de Células Mesenquimales, Fosfato Tricálcico y Matriz Ósea desmineralizada para Uso Clínico.

Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Presentada por:

María del Mar González García.

Dirigida por:

Prof. Dr. D Miguel Ángel Fernandez-Villacañas Marín.

Prof. Dr. D Francisco Javier Rodríguez Lozano.

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Agradecimientos

Agradecimientos

Gracias por darme la oportunidad de poder estar escribiendo estas palabras, que nunca podrán expresar la admiración y el agradecimiento.

Al Profesor Dr. Miguel Ángel Fernandez Villacañas Marin por la dirección de esta Tesis, por su guía, consejos y paciencia... Quien a pesar de sus muchas ocupaciones consiguió sacar todas las semanas huecos para sacar esta tesis adelante.

Al Profesor Dr. Francisco Javier Rodríguez Lozano por la dirección de esta Tesis, por su inestimable ayuda no solamente en la misma si no en el campo de trabajo que ha hecho que de esta tesis surja una colaboración presente y por y para futuro. Gracias en general por facilitarme el formar parte del mundo de la investigación.

Al Dr. Carlos Manuel Martínez Cáceres por haber facilitado tanto la tarea histológica, han sido muchos los “raticos” sacrificando ratones y mucho el trabajo que te di después.

A M^a Dolores López Lucas y la Dra. Ana M^a García Hernández por haber preparado gran parte de ese constructo, con las cincuenta mil dificultades que han surgido por el camino y que sin él ni la palabra estaría inventada.

Al grupo de Terapia Celular y Trasplante hematopoyético que dirige el Dr. Moraleda, el cual nos ha enseñado a ver la Terapia Celular como una herramienta novedosa en nuestra práctica clínica.

A la Profesora Dra. Matilde Moreno Cascales, ya que ha motivado mi espíritu investigador desde aquellos comienzos con el Master de Anatomía.

A la Profesora Dra. Matilde Campos Arana, sin su profesional ayuda nada de lo expuesto hubiese sido posible. Sus poemas reconfortaron además los momentos de ahogo.

A la Profesora Vivina Asensi Artiga a pesar de encontrarse recientemente retirada del campo de la enseñanza sacó un poco de su tiempo para asesorar la tan dificultosa bibliografía.

A la Dra. M^a Ángeles Rodríguez González, por su confianza y apoyo. Por haberme permitido formar parte de su proyecto. Es un verdadero lujo el poder formar parte de su equipo.

Al Dr. Victor Villanueva San Vicente, por estar siempre animando a ser mejor médico. Por poner el estímulo necesario para llevar a cabo esta difícil tarea y saber tener paciencia conmigo.

Al Dr. Tomas Palazón Tovar por poner a mi disposición todos sus conocimientos y sabiduría, tanto en lo profesional como en lo personal.

A todos mis compañeros y tengo la suerte de poder decir amigos, adjuntos, residentes y personal que trabajan en el Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca por estar ahí, en los momentos buenos y malos.

Al Ministerio de Sanidad y Consumo por autorizar y financiar el Ensayo clínico EC11-009 que ha propiciado esta Tesis.

A mi marido Jose, por ser mi mitad. Como dice nuestra canción, “Sin tí no soy nada”. Porque nos sobran las palabras y porque ahora esperamos juntos la llegada de Adriana.

A mis padres, gracias por la educación que he recibido. Nunca alcanzaré a agradecerlos lo suficiente todo el esfuerzo y dedicación que habéis tenido que realizar para que pueda estar donde estoy. Y lo que es más importante, ser feliz.

A mi hermano Xema, porque no me puedo imaginar una vida sin su presencia.

A mis cuñados, tíos y resto de mi familia por creer en mí y aguantar mis cabezonerías.

A mis amigos, por estar ahí, a pesar de la distancia.

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Índice

JUSTIFICACIÓN.	19
GLOSARIO DE TÉRMINOS.	25
ÍNDICE DE FIGURAS.	31
ÍNDICE DE TABLAS.	37
INTRODUCCIÓN	43
BLOQUE I	
1. BIOLOGÍA ÓSEA.	45
1.1 Conceptos generales	45
1.2 Estructura ósea	47
1.3 Matriz extracelular ósea	50
a.) Constituyentes orgánicos (matriz orgánica u osteoide).	50
b.) Constituyentes inorgánicos.	51
c.) Sustancia amorfa (matriz amorfa o sustancia fundamental)	52
1.4 Componentes celulares.	53
a.)Células osteoprogenitoras.	53
b.)Osteoblastos.	54
c.)Osteocitos.	55
d.)Células de revestimiento óseo.	55
e.)Osteoclastos.	56
1.5 Osteogénesis. Embriología.	57
a.) Osificación.	58
a.1) Osificación Membranosa.	58
a.2) Osificación Encondral.	59
1.6 Tipos de hueso según estructura.	60
a.) Hueso fibrilar inmaduro o hueso primitivo.	60
b.) Hueso laminar maduro.	60
b.1) Cortical.	61
b.2) Esponjoso.	62
BLOQUE II	
2. ESTADO ACTUAL DE LA INGENIERÍA TISULAR DEL TEJIDO ÓSEO.	63
3. COMPONENTES.	65

3.1 Componentes celulares.	65
a.) Célula madre. Definición.	65
b.) Células madre embrionarias (CME).	66
c.) Células madre pluripotenciales inducidas (IPs)	68
d.) Células embrionarias de carcinoma.	69
e.) Células madre embrionarias germinales y fetales.	70
f.) Células madre adultas.	70
3.2 Células osteoprogenitoras.	73
a.) La médula ósea como fuente de células osteoprogenitoras.	75
b.) Células madre mesenquimales (MSC).	76
c.) Efecto osteogénico de las células mesenquimales.	77
d.) Matrices o sustratos.	78
3.3 Factores de crecimiento.	82
 HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO DEL ESTUDIO.	85
4.1 OBJETIVO General.	89
4.2 OBJETIVOS Específicos.	89
 MATERIAL Y MÉTODO.	91
1. Obtención de las Células Madre Mesenquimales (MSC).	93
1.1 Selección de donantes.	93
1.2 Consentimiento informado.	94
1.3 Obtención de médula ósea humana.	94
2. Aislamiento y cultivo de Células Madre Mesenquimales (MSC)	95
2.1 Cultivo 1º.	97
2.2 Primer Pase.	98
2.3 Segundo Pase.	99
2.4 Siembra de Células Madre Mesenquimales (MSC) sobre Fosfato Tricálcico (FTC).	101
2.5 Acondicionamiento.	105
3. Controles para evaluar la calidad de las células.	106
3.1 Microbiología.	106

3.2 Morfología.	106
3.3 Vitalidad.	107
3.4 Cariotipo.	107
3.5 Proliferación.	108
3.6 Inmunofenotipo.	108
3.7 Diferenciación.	109
3.8 Estudio de cinética / proliferación (MTT) del cultivo de células mesenquimales sobre fosfato tricálcico.	111
3.9 Estudio de microanálisis del biomaterial.	113
4. Desarrollo del constructo.	115
5. Modelo animal.	117
5.1 Características del modelo murino NOD/SCID.	119
5.2 Condiciones de mantenimiento y seguimiento de los animales.	121
5.3 Seguridad del procedimiento.	124
5.4 Cronograma de tareas.	125
6. Implante del constructo en el ratón.	128
6.1 Protocolo de anestesia y técnica quirúrgica.	128
6.2 Protocolo de necropsia.	133
7. Hoja de recogida de datos.	138
8. Estudios de toxicidad aguda.	138
8.1 Peso.	139
8.2 Índice de bienestar animal.	139
8.3 Parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos.	143
9. Estudios de toxicidad crónica.	145
10. Ensayos de biodistribución.	146
11. Estudios de eficacia.	148
11.1 Estudios histológicos hematoxilina-eosina.	148
12. Análisis estadístico.	151
 RESULTADOS	 153
1. Evaluación clínica precirugía de implante del constructo.	157
1.1 Índice de bienestar animal.	157

1.2 Peso.	157
2. Evaluación cirugía de implante del constructo.	169
3. Evaluación de toxicidad aguda.	161
3.1 Índice de bienestar animal.	161
3.2 Peso.	162
3.3 Parámetros hematológicos.	167
3.4 Histología en ratones NOD / SCID del grupo I (caso) sacrificados tras 24h. y 48h. de la cirugía.	169
4. Ensayos de toxicidad crónica.	171
4.1 Índice de bienestar animal.	171
4.2 Peso.	173
4.3 Parámetros hematológicos.	177
4.4 Examen histológico en hematoxilina-eosina.	183
5. Ensayos de biodistribución.	197
5.1 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por retrotranscripción (PCR-RT).	197
6. Análisis de eficacia del implante del constructo.	211
6.1 Estudios histológicos hematoxilina eosina.	211
6.2 Análisis cualitativo de osteoblastos humanos en tejido óseo mediante inmunohistoquímica con anticuerpo anti-osteocalcina humana.	220
6.3 Análisis cuantitativo de osteoblastos humanos en tejido óseo mediante inmunohistoquímica con anticuerpo anti-osteocalcina humana.	224
DISCUSION.	229
1. Diseño del estudio	231
2. Terapia celular y células mesenquimales de médula ósea.	232
3. Seguridad en el uso del constructo (MSC+FTC+MOD).	236
4. Toxicidad aguda y crónica del implante MSC+FTC+MOD.	237
5. Biodistribución del constructo (MSC+FTC+MOD).	239
6. Eficacia del constructo (MSC+FTC+MOD).	242
7. Perspectivas futuras.	245

CONCLUSIONES..	247
BIBLIOGRAFÍA.	251
ANEXOS.	277
1 Dictamen evaluación Comité Ético Investigación Clínica del	279
2 Consentimiento informado para la donación de muestras	282
3 Dictamen evaluación Comité de Ética de Experimentación Animal del HCUVA.	285
4 Hoja de recogida de datos.	286
5 Protocolo normalizado de trabajo del día del sacrificio de los ratones NOD/SCID.	288
6 Petición de servicios Biobanco.	291
7 Protocolo normalizado de trabajo de evaluación clínica	292
8 Índice de bienestar animal.	294

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Justificación

La regeneración de los tejidos se produce de forma natural pese a la existencia de unas pocas células madre con capacidad de autorrenovación y de diferenciación.

Estas células madre son las encargadas de mantener la función tisular a lo largo de toda la vida del individuo. En los últimos 15 años se han realizado grandes avances en el conocimiento de este tipo de células, de los genes que regulan su destino hacia la quiescencia o la diferenciación, y de los nichos que aportan las señales específicas para modular este comportamiento.

El avance tecnológico ha permitido clonar seres vivos a partir del material genético de una célula madura y, más recientemente, inducir células con potencial embrionario mediante la inserción de genes clave en el ADN de una célula diferenciada. En definitiva, parece que la ciencia está en camino de desvelar los misterios que regulan la vida y la muerte de un tejido. Y lo que es más importante, la ciencia está en el camino adecuado para adquirir herramientas para modularlos.

Independientemente de los problemas éticos que aún quedan por resolver, la posibilidad de usar células madre como agentes terapéuticos ha revolucionado el mundo de la Medicina, acuñándose el término de Terapia celular o Medicina Regenerativa para los tratamientos basados en este concepto.

El estudio de regeneración ósea potenciando el poder osteogénico de las células madre puede ser tremendamente útil en el tratamiento de diversas enfermedades del territorio maxilofacial que incluya maxilar o mandíbula y que actualmente poseen un complicado manejo terapéutico.

La regeneración ósea en el territorio maxilofacial puede ser aplicada tanto a atrofas o defectos óseos como a patologías que cursen con necrosis ósea maxilar.

La osteonecrosis maxilar suele ser secundaria a osteomielitis, tratamiento con bifosfonatos orales o intravenosos, tratamientos con radioterapia de cabeza y cuello. En cualquiera de estos caso la clínica incluye presencia de hueso expuesto o necrótico, dolor, fístulas intra o extraorales, fractura patológicas y osteólisis

La ingeniería tisular es actualmente una vía de investigación clínica y fundamental cuyo objetivo es recrear tejidos u órganos similares a los tejidos y órganos originales con la ayuda de células y matrices que actúan como soporte para la adhesión celular y como vehículos de moléculas biológicamente activas.

El objetivo de las investigaciones planteadas en ingeniería tisular ósea, es reparar pérdidas de sustancia ósea mediante sistemas que permitan reconstruir un hueso natural sin necesidad de recurrir a la extracción de un injerto óseo autólogo. Los injertos óseos y en especial el injerto óseo esponjoso autólogo están considerados como el procedimiento de elección para obtener una verdadera reconstrucción ósea. Pero estas técnicas presentan una serie de desventajas relacionadas con la morbilidad para el paciente (cicatrices dolorosas, infecciones locales, hernias musculares, fracturas de estrés, incremento estancia hospitalaria, etc.) bien documentadas en la literatura científica.

Por tanto la posibilidad de obtener regeneración ósea a través del potencial osteogénico de las células mesenquimales del propio paciente hace casi obligatoria su investigación considerándola una prioridad en la ciencia actual.

Con el objetivo de establecer una terapia adecuada para el tratamiento de las enfermedades arriba citadas basada en terapia celular, se diseñó el Ensayo clínico en fase I con número de autorización EC11-009: De utilización de células mesenquimales de médula ósea autólogas sembradas sobre matriz porosa de fosfato tricálcico y matriz ósea desmineralizada en pacientes con osteonecrosis maxilar. La primera fase del cual consiste en el estudio de la seguridad del constructo de células mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea desmineralizada para ser empleado en paciente susceptibles de este tratamiento.

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Glosario de Términos

AEMPS :	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios.
ASC :	Adult stem cell, células madre adultas.
B.O.E :	Boletín oficial del estado.
BMP:	Proteína morfogenética ósea.
CEEA :	Comité de Ética de Experimentación Animal.
CEIB :	Centro de Investigación Biomedica.
CEIC :	Comité Ético de Investigación Clínica.
CFU-F:	Células adherentes formadoras de colonias.
CM:	Células madre.
CME :	Células madre embrionarias.
CMN :	Células mononucleadas.
CO ₂ :	Dióxido de carbono.
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle's medium.
DI :	Decilitros.
DPBS :	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline,
ECC :	Embryonic Carcinoma Cells, células madre embrionarias de carcinoma.
EDTA :	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGC :	Células madre embrionarias germinales.
FR :	Frecuencia respiratoria
FGF-3:	Factor de crecimiento fibroblástico tipo 3.
FGFs:	Factor de crecimiento de fibroblastos.
FTC:	Fosfato tricálcico.
G.:	Gramos
GH:	Hormona del crecimiento.
Glu :	Glucemia.
GOT:	Transaminasa glutámico oxalacética.
GPT :	Transaminasa glutámico-pirúvica.
H:	Horas
HA:	Hidroxiapatita.

GLOSARIO

Hb :	Hemoglobina.
HCUVA :	Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.
IC :	Intervalo de confianza al 95%
ID :	Número de identificación.
ID :	Identificación
IGF:	Factor de crecimiento insulínico.
Ind H :	Índice de hemólisis.
IPs :	Células madre pluripotenciales inducidas.
ISCT:	Sociedad Internacional para Terapia Celular
L :	Litros
LP :	Lisado plaquetario.
MC:	Medio de crecimiento
Mg.:	Miligramos
MO :	Médula ósea.
MOD:	Matriz ósea desmineralizada.
MSC:	Células madre mesenquimales.
MTT :	Estudio de sales de tetrazolio.
NACF:	Necrosis avascular de cabeza femoral.
NOD/SCID:	Diabéticos no obesos con inmunodeficiencia severa combinada.
OCT	Optimum Cutting Temperature.
ONM:	Osteonecrosis maxilar.
PBS	Phosphate-buffered saline.
PCR :	Reacción en cadena de la polimerasa.
PCR-RT :	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa por retrotranscripción.
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PLAQ :	Plaquetas.
Rpm :	Revoluciones por minuto.
SEM :	Scanner de microscopía electrónica.
SPF :	Libres de patógenos específicos.
SSF 0,9%:	Suero salino fisiológico al 0,9%.

GLOSARIO

TGF- β :	Factores de crecimiento transformante β .
UM:	Universidad de Murcia.
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular.

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Osteona o sistema de Havers. Figura extraída de Atlas y textos de Histología de Gartner (5).	49
Figura. 2 Esquema de obtención de la fracción mononucleada de médula ósea con gradiente de Ficoll.	97
Figura 3. Colocación del fosfato tricálcico en la jeringa previa a su mezcla con lisado plaquetario.	102
Figura 4. Relleno de pocillos con FTC.	104
Figura 5. Imagen microscopio óptico de células en cultivo primario y tras pase 2.	107
Figura 6. Imagen microscopio óptico de células mesenquimales diferenciadas.	110
Figura 7. Imagen cambio de color y curva patrón de crecimiento.	112
Figura 8. Ultraestructura en Scanner de microscopía electrónica.	114
Figura 9. Pocillos con cultivo de MSC en FTC (M) y pocillo con cultivo de SSF 0,9% + FTC (C).	116
Figura 10. Estudio de implante de constructo formado por (MSC+FTC+MOD) y (FTC+SSF 0,9%+MOD) MSC(Células Madre Mesenquimales); FTC (Fosfato Tricálcico); SSF (Suero salino fisiológico).	119
Figura 11. Campana/Cabina de flujo laminar.	122
Figura 12. Racks ventilados.	123
Figura 13. Cronograma de procedimientos de estudio (semanas 1ª a 8ª)	125
Figura 14. Cronograma de procedimientos de estudio (semanas 9ª a 16ª)	126
Figura 15. Cronograma de procedimientos de estudio (semanas 17ª a 24ª)	126
Figura 16. Carrito con respirador y toma de oxígeno empleado durante la anestesia.	129
Figura 17. Material preprado dentro de la campana de flujo laminar.	130
Figura 18. Secuencia de tratamiento quirúrgico. 1. Colocación del ratón. 2. Incisión. 3. Disección subcutánea. 4 Colocación de constructo subcutáneo. 5 Colocación de constructo intramuscular. 6 Cierre.	132
Figura 19. Secuencia necropsia. 1. Colocación ratón decúbito supino. 2. Disección de tórax y cavidad abdominal. 3. Sección esternal. 4. Punción Cardíaca. 5 Disección pulmonar. 6. Constructo subcutáneo derecha e intramuscular izquierdo.	135
Figura 20. Lavado de la sección de tibia.	136
Figura 21. Médula ósea extraída.	136
Figura 22. Muestras debidamente marcadas y conservadas en hielo dispuestas en criomoldes para su posterior análisis PCR-RT.	137

Figura 23. Analizadora automática CELL-DYN Sapphire® Abbott Laboratories.	144
Figura 24. Evolución de peso medio de ratones NOD/SCID estratificado por sexo al 1º y 2º día postcirugía.	163
Figura 25. Evolución de peso medio de ratones NOD/SCID estratificado por constructo al 1º y 2º día postcirugía.	164
Figura 26 Fotografía agregado plaquetario de sangre periférica de ratón NOD/SCID (Hematoxilina-Eosina 200x).	168
Figura 27. Medias en gramos de pesos de los ratones NOD/SCID del estudio, precirugía, a la semana de la cirugía, a las 2 semanas, a las 5, 7, 9 y 12 semanas de la cirugía.	173
Figura 28. Medias en gramos de pesos de los ratones NOD/SCID machos y de los ratones NOD/SCID hembras del estudio, precirugía, a la semana de la cirugía, a las 2 semanas, a las 5, 7, 9 y 12 semanas de la cirugía.	174
Figura 29 Medias en gramos de pesos de los ratones NOD/SCID del grupo I caso y de los ratones NOD/SCID del grupo II control del estudio, precirugía, a la semana de la cirugía, a las 2 semanas, a las 5, 7, 9 y 12 semanas de la cirugía.	176
Figura 30. Imagen de microscopía óptica de sección de corazón de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).	184
Figura 31. Imagen de microscopía óptica de sección de pulmón de ratón NOD/SCID donde se evidencia patrón intersticial (Hematoxilina-Eosina 200x).	185
Figura 32. Imagen de microscopía óptica de sección de pulmón de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).	186
Figura 33. Imagen de microscopía óptica de sección de hígado de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).	187
Figura 34. Imagen de microscopía óptica de sección de bazo NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).	188
Figura 35. Imagen de microscopía óptica de sección de riñón de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).	189
Figura 36. Imagen de microscopía óptica de sección de ovario de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).	190
Figura 37. Imagen de microscopía óptica de sección de cerebro de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).	191

Figura 38. Imagen de microscopía óptica de sección de médula ósea de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).	192
Figura 39. Imagen de microscopía óptica de sección de tejido óseo de tibia ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).	193
Figura 40. Imagen de sección de constructo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 200x). (C) tejido conectivo. (<) Núcleo osificación.	194
Figura 41. 1 Imagen de sección de constructo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 100x). 2 Imagen de sección de constructo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Tricómico Masson 100x)(C) tejido conectivo de hueso neoformado. (M) Músculo.	211
Figura 42. 3 Imagen de sección de constructo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 100x). 4 Imagen de sección de constructo subcutáneo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 200x) (C) tejido conectivo. (<) Núcleo osificación. (L) zona de linfangiectasia.	212
Figura 43. 5 Imagen de sección de constructo subcutáneo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 100x). 6 Imagen de sección de constructo subcutáneo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 200x)(*) tejido de hueso neoformado.	212
Figura 44. 7 Imagen de sección de constructo intramuscular FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 100x). 8 Imagen de sección de constructo intramuscular FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 200x)(*) tejido de hueso neoformado.	213
Figura 45. Evolución formación ósea ratones NOD/SCID de implante subcutáneo de los casos (modelo de constructo tipo 1).	218
Figura 46. Evolución formación ósea ratones NOD/SCID de implante intramuscular de los casos (modelo de constructo tipo 1).	219
Figura 47. Imagen de sección de constructo MSCH-FTC-MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso a 630x con positividad para anticuerpo antiosteocalcina humana en la 12ª semana postcirugía (Ratón 12N104).	221
Figura 48. Imagen de sección de constructo MSC+FTC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso a 400x con osteoblastos y osteocitos osteocalcina humana positivos en la 12ª semana postcirugía. (Ratón 12N119).	222

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Materiales para implantes óseos. Extractado y adaptado de Ikada (123).	81
Tabla 2. Controles de calidad (CC) durante el proceso de cultivo y expansion de Células Stem Mesenquimales.	100
Tabla 3. Controles internos en proceso de siembra de MSC sobre fosfato tricálcico.	104
Tabla 4. Controles para evaluar la calidad de las células.	108
Tabla 5. Porcentaje de células que expresaron estos marcadores en cada una de las muestras.	109
Tabla 6 . Cronograma de sacrificios del estudio en semanas 0 a 12 ^a .	127
Tabla 7. Medidas de actuación fijadas en función del score obtenido en cada animal.	142
Tabla 8. Registro de datos de ratones NOD/SCID en el que figura el número de identificación (ID) con su código numérico asignado, género, código de biobanco asignado, fecha de la cirugía y rama de tratamiento.	156
Tabla 9. Peso medio (IC) de ratones NOD/SCID previo a la cirugía estratificado por sexo.	157
Tabla 10. Peso medio (IC) de ratones NOD/SCID previo a la cirugía estratificado por modelo de constructo implantado.	158
Tabla 11. Variación de peso ponderal en términos globales de ratones NOD/SCID en los primeros dos días postcirugía.	162
Tabla 12. Peso medio (g.) de ratones NOD/SCID estratificado por sexo implantado precirugía 1º y 2º día postcirugía.	163
Tabla 13. Peso medio (g.) de ratones NOD/SCID estratificado por modelo de constructo implantado precirugía 1º y 2º día postcirugía.	165
Tabla 14. Variación de peso ponderal de ratones NOD/SCID estratificado por sexo, precirugía y en los primeros dos días postcirugía (Test T Student).	166
Tabla 15. Variación de peso ponderal de ratones NOD/SCID estratificado por constructo, precirugía y en los primeros dos días postcirugía (Test T Student).	166
Tabla 16. Registro de datos de ratones NOD/SCID en el que figura el sexo, tipo de constructo y índice de bienestar animal obtenido en el período de evaluación de toxicidad crónica.	172
Tabla 17. Peso medio (g.) de ratones NOD/SCID estratificado por sexo durante el periodo de evaluación de toxicidad crónica.	175
Tabla 18. Peso medio (g.) de ratones NOD/SCID estratificado por modelo de constructo implantado durante el periodo de evaluación de toxicidad crónica.	176

Tabla 19. Parámetros hematológicos medios ratones NOD/SCID evaluados en el período crónico.	177
Tabla 20. Parámetros hematológicos medios ratones NOD/SCID evaluados en el período crónico estratificado por sexo.	178
Tabla 21. Parámetros hematológicos medios ratones NOD/SCID evaluados en el período crónico estratificado por constructo implantado.	179
Tabla 22. Parámetros bioquímicos medios ratones NOD/SCID evaluados en el período crónico.	180
Tabla 23. Parámetros bioquímicos medios ratones NOD/SCID evaluados en el período crónico estratificado por sexo.	181
Tabla 24. Parámetros bioquímicos medios ratones NOD/SCID evaluados en el período crónico estratificado por constructo implantado.	182
Tabla 25. PCR-RT para Actina murina ratones NOD/SCID.	198
Tabla 26. Amplificación PCR-RT para Actina murina ratones NOD/SCID.	199
Tabla 27. Amplificación PCR-RT para Actina murina ratones NOD/SCID estratificado por sexo.	200
Tabla 28. Amplificación PCR-RT para Actina murina ratones NOD/SCID estratificado por rama de tratamiento.	200
Tabla 29. PCR-RT para β 2microglobulina murina ratones NOD/SCID.	202
Tabla 30. Amplificación PCR-RT para β 2microglobulina murina ratones NOD/SCID.	203
Tabla 31. Amplificación PCR-RT para β 2microglobulina murina ratones NOD/SCID estratificado por sexo.	204
Tabla 32. Amplificación PCR-RT para β 2microglobulina murina ratones NOD/SCID estratificado por grupo de tratamiento.	204
Tabla 33. PCR-RT para Actina humana ratones NOD/SCID.	206
Tabla 34. PCR-RT para β 2microglobulina humana ratones NOD/SCID.	208
Tabla 35. Hallazgos histológicos relevantes en el modelo de constructo implantado de todos los ratones	214
Tabla 36. N° ratones NOD/SCID (constructo tipo 1) en los que se ha evaluado la formación ósea Subcutáneo según periodo de sacrificio.	216
Tabla 37. N° ratones NOD/SCID (constructo tipo 1) en los que se ha evaluado la formación ósea intramuscular según periodo de sacrificio.	217
Tabla 38. N° ratones NOD/SCID (constructo tipo 2) en los que se ha evaluado la formación ósea subcutánea según periodo de sacrificio.	217
Tabla 39. N° ratones NOD/SCID (constructo tipo 2) en los que se ha evaluado la formación ósea intramuscular según periodo de sacrificio.	217

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 40. N° de ratones NOD/SCID que presentan positividad a osteoblastos humanos (osteocalcina POSITIVOS). Implante subcutáneo.	222
Tabla 41. N° de ratones NOD/SCID que presentan positividad a osteoblastos humanos (osteocalcina POSITIVOS). Implante intramuscular.	223
Tabla 42. Número de osteoblastos humanos osteocalcina POSITIVOS por cada 10 campos 400x.	225
Tabla 43. Media de N° de osteoblastos humanos osteocalcina POSITIVOS por cada 10 campos 400x implantados de forma subcutánea e intramuscular a los dos grupos.	226

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Introducción

BLOQUE I

1. BIOLOGÍA ÓSEA.

1.1. Conceptos Generales.

La capacidad de los huesos para desempeñar su función esquelética se debe a los tejidos óseo y cartilaginoso. El esqueleto humano es un sistema biológico que está formado por el tejido óseo y tejido cartilaginoso. El esqueleto óseo es una estructura propia de los vertebrados.

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado (1), el almacén que soporta nuestro cuerpo y protege nuestro órganos y partes blandas y permite nuestros movimientos. En su interior se encuentra la médula ósea que es portadora de células madre y la encargada de proporcionar células sanguíneas (2).

Las funciones básicas de los huesos y del esqueleto son:

Soporte mecánico: los huesos proveen un almacén que mantiene la morfología corporal dando soporte a músculos y tejidos blandos.

Contención y protección: de cavidades corporales ante traumatismos. sirven de revestimientos o “corazas” para diferentes órganos.

Soporte dinámico: gracias a los músculos que se insertan colabora para la marcha, locomoción y movimientos corporales funcionando como palancas y puntos de anclaje para los músculos transformando las contracciones de los músculos en movimientos útiles (3).

Homeostasis metabólica : almacena una serie de iones y de minerales, sobretodo, calcio y fósforo funcionando como moderador (tampón o amortiguador) de la concentración e intercambio con el organismo de sales de calcio y fosfatos. (4).

Almacenamiento de triglicéridos: la médula ósea amarilla está constituida principalmente por adipocitos, los cuales almacenan triglicéridos.

Hematopoyesis o producción de células sanguíneas: en el tejido conectivo denominado médula ósea se genera la producción de glóbulos rojos y en menor cantidad linfocitos y monocitos.

El tejido óseo presenta propiedades mecánicas como la resistencia a la tracción y compresión y aunque es un tejido muy duro posee de cierta elasticidad y flexibilidad con un bajo peso, lo que le confiere una gran eficiencia. El hueso posee una resistencia a la tensión similar a la del hierro, es tres veces más ligero y diez veces más flexible.

El tejido óseo tiene un comportamiento anisótropo, esto quiere decir que presenta diferentes características mecánicas según sea la dirección de la carga. Los tipos de carga que soporta el hueso son de compresión, cizallamiento, torsión tracción y flexión. Es un tejido dinámico en renovación constante durante toda la vida del individuo (2). La presencia de agua, en torno al 3% en sujetos adultos sanos, disminuye de forma progresiva con la edad. Además es un tejido que posee una gran respuesta a estímulos mecánicos, metabólicos, nutritivos y endocrinos, en función de los cuales se realizan procesos de crecimiento, modelación y remodelación ósea.

1.2. Estructura Ósea.

Estructuralmente, el esqueleto consiste en 206 huesos aproximadamente (sin contar dientes, los huesos suturales y los sesamoideos). En la estructura de los huesos participan tejido óseo y tejido cartilaginoso que en su interior contiene la médula ósea y rodeado por el periostio formado por tejido fibroso.

El tejido óseo, a nivel macroscópico posee zonas de diferente densidad: hueso compacto o cortical y hueso esponjoso o trabecular, que poseen diferentes propiedades biomecánicas.

El hueso compacto o cortical representa el 80% del volumen total del hueso. A pesar del que el tejido óseo tiene, en general, carácter anisotrópico y homogéneo del hueso, el hueso cortical presenta un comportamiento más isotrópico. Se encuentra localizado predominantemente en las diáfisis de los huesos largos y en la porción externa del resto de huesos. El hueso compacto es un tejido muy organizado que confiere al hueso resistencia a la tracción por poseer un menor porcentaje de materia orgánica.

La matriz ósea está depositada en forma de láminas concéntricas alrededor de unos canales longitudinales llamados conductos de Havers. Los canales de Volkmann de disposición transversal u oblícuo comunican los conductos de Havers entre sí y con la superficie interna y externa de hueso

por los que pasan vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios del hueso (4). Los osteocitos poseen prolongaciones para intercambiar nutrientes con el líquido intersticial y cada *lacunae* dispone de una serie de canalículos, por donde se extienden prolongaciones de los osteocitos, denominados calcóforos. Los canalículos están conectados entre sí y, eventualmente a los canales de Havers. El conjunto formado por un conducto de Havers con su eje longitudinal paralelo al eje longitudinal del hueso, de 4 a 20 láminas concéntricas que lo rodean, las *lacunae*, canalículos y osteocitos en ellas incluidos recibe el nombre de osteona o sistema de Havers y es la unidad anatómica y funcional del tejido óseo compacto (Figura 1). Las restantes láminas entre osteonas se llaman láminas intersticiales (1,3).

El hueso esponjoso o trabecular presenta mayor grado de anisotropía. Está formado, de igual modo por láminas pero sin sistemas de Havers. Se disponen de forma forma irregular formando unos tabiques o placas, estas láminas intersticiales forman la unidad estructural básica denominada trabécula o osteona trabecular y no suelen contener vasos sanguíneos en su interior; el espacio entre las distintas trabéculas óseas se encuentra rellenó por médula ósea roja. Los osteocitos se localizan en el interior de las trabéculas con canalículos que irradian desde las mismas y se nutren por difusión desde la superficie cubierta por endostio (3).

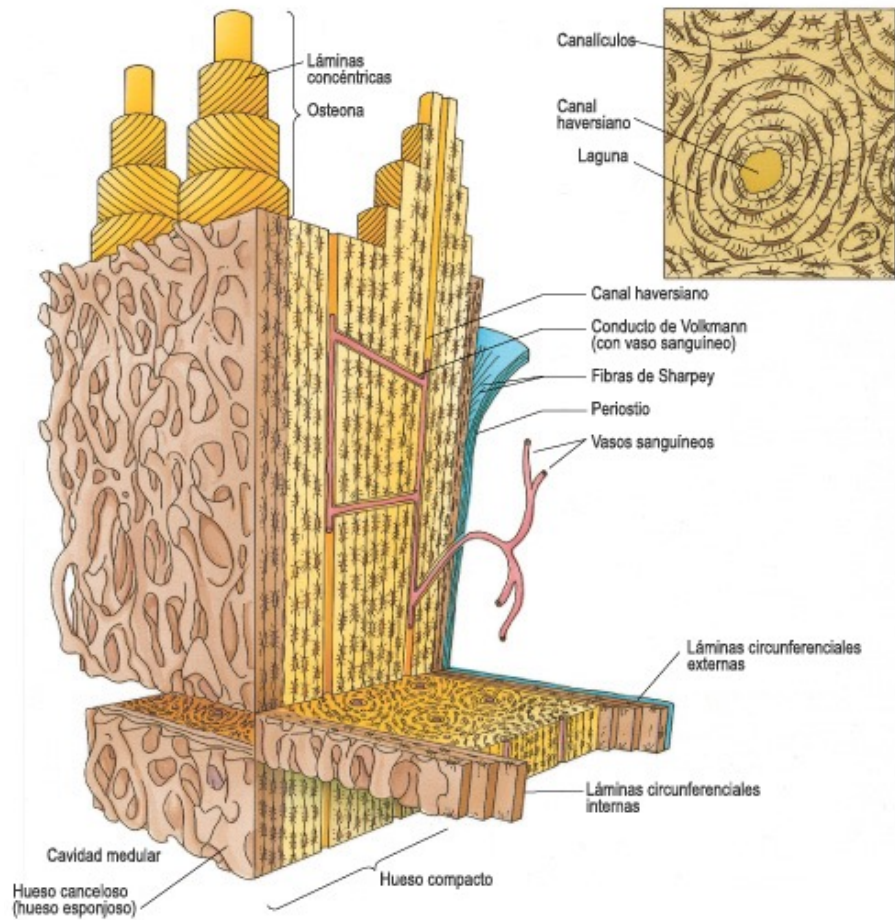


Fig.1. Osteona o sistema de Havers. Figura extraída de Atlas y textos de Histología de Gartner (5).

1.3. La Matriz Extracelular Ósea.

El tejido óseo está formado en un 99% por una matriz ósea que se encuentra mineralizada (hueso cortical: 99,9%; hueso esponjoso: 99,2%), diferenciándose un componente orgánico y otro inorgánico dentro de esta matriz ósea. La matriz ósea es responsable de las propiedades biomecánicas del hueso. De forma general, la resistencia y la rigidez la aporta la fase inorgánica (sales minerales) mientras que la elasticidad (o la resistencia a la fractura) la aporta la fase orgánica (fibras colágena) (6).

a. Constituyentes orgánicos (matriz orgánica u osteoide).

La parte orgánica de la matriz ósea constituye aproximadamente el 50% del peso seco del hueso, alrededor de un 90% de la matriz orgánica son fibrillas de colágeno I de unas 5 μm de grosor, organizadas aleatoriamente formando un **entramado**.

El 5- 15% restante está formado por otras proteínas como la osteonectina que es una fosfoproteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K que puede interaccionar tanto con el colágeno como con las sales inorgánicas, es una proteína altamente reactiva que se localiza preferentemente en las áreas de mayor grado de calcificación, la osteonectina (también llamada SPRC o BM-40 (Secreted Protein Cystein Rich) está codificada por el gen 5q31.3-q32 y está implicada en la adhesión celular (7).

Además de las anteriores está presente la osteocalcina (también llamada Proteína Gla) y que se caracteriza por la presencia de tres residuos de ácido γ -carboxiglutámico. Este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis. (8,9).

También se encuentran glicoproteínas como la osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina, estas

glicoproteínas son fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos. Presentan una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocida por las integrinas de los osteoblastos ($\alpha\text{v}\beta3$, entre otras). Igualmente están presentes las proteínas óseas morfogenéticas (BMPs) que juegan un papel similar al de los factores de crecimiento y los proteoglicanos (biglicano, decorina) (10).

Las fibras colágenas se disponen en láminas paralelas pero en cada lámina las fibras forman un ángulo agudo con respecto a las de las láminas contiguas. Esta disposición determina que al observar hueso laminar mediante luz polarizada alternen las láminas claras de aspecto muy brillante (láminas birrefringentes: fibras orientadas perpendicularmente a luz polarizada) con las oscuras (láminas no birrefringentes: fibras orientadas en un ángulo más o menos agudo con respecto a la luz polarizada) (9).

b. Constituyentes inorgánicos.

El componente inorgánico de la matriz ósea está constituido en su mayor parte por fosfato cálcico tricálcico, carbonato cálcico y fosfato octacálcico $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2]$ en forma de cristales aplanados de hidroxiapatita de $30\text{nm} \times 3\text{nm}$ que aparecen a intervalos regulados de 60nm a 70nm a lo largo de las fibrillas colágenas. Esta arquitectura de fibras de colágeno muy organizada y reforzada con cristales inorgánicos permite disponer de un tejido elástico y duro.

En menor cantidad contiene sulfatos, fluoruros, ion de estroncio e hidróxido de magnesio, que se encuentran depositados en una retícula formada por las fibras de colágeno (4). Los cristales de fosfato cálcico se localizan en los espacios que existen entre moléculas adyacentes de colágeno formando así estructuras bifásicas.

El proceso por el cual estas sales se depositan y cristalizan en la retícula se denomina calcificación y se desarrolla a partir de la glucosa-6-fosfato que

una vez en la zona de osificación se desdobra por la encima fosfatasa alcalina en ion fosfato y glucosa. El fosfato se une al calcio proveniente de la sangre para formar una de fosfato cálcico que precipita formando cristales.

c. Sustancia intercelular amorfa (matriz amorfa o sustancia fundamental).

Es un gel semilíquido incoloro y ópticamente homogéneo, muy hidratado en el que se encuentran embebidas las células y las fibras, de forma que permite la movilidad de las células y la difusión de sustancias. Rellena los espacios entre las células y las fibras del tejido correctivo.

Formada, principalmente por complejos de glucosaminoglicanos, polímeros largos de disacáridos repetidos, que pueden ser no sulfatado (ácido hialurónico) o sulfatados (heparina) (5).

Estos están asociados a proteínas formando proteoglicanos, que están también asociados a glucoproteínas estructurales de adherencia, agua y sales. Estas moléculas de colágeno y glucosaminoglicanos de la sustancia amorfa están producidas y segregadas por los fibroblastos.

La función principal es la difusión de nutrientes, barrera de protección y dar consistencia al tejido ya que retiene el agua (5).

1.4. Componentes Celulares Del Tejido Óseo.

En el hueso coexisten varios tipos de células:: las células progenitoras, los osteoblastos, los osteocitos, las células de revestimiento óseo (o células del endostio o “living cells”) y los osteoclastos. Los tres primeros se consideran como tipos celulares distintos y pertenecientes a una misma línea o estirpe celular con la capacidad de transformarse uno en otro por lo que es más razonable considerarlos como estadios funcionales diversos de un mismo tipo celular. También pueden distinguirse monocitos, linfocitos, macrófagos, adipocitos y células endoteliales (9).

a) Células osteoprogenitoras.

Se originan de células mesenquimales primitivas. De las células mesenquimales embrionarias pueden originarse cinco estirpes celulares diferentes: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipoblastos y mioblastos, en respuesta a diferentes señales moleculares que proceden de las células mesenquimáticas primitivas y que se diferenciarán a una población de células u otra (9,10).

Morfológicamente, las células osteoprogenitoras son células fusiformes que se localizan en las superficies óseas que no están sufriendo el proceso de reabsorción. Son unas células no especializadas capaces de dividirse y transformarse en osteoblastos, estas células se encuentran en la capa más profunda del periostio, revistiendo los conductos de Havers, en el endostio y en los canales perforantes del hueso que contienen los vasos sanguíneos. A partir de estas células se generan los osteoblastos y los osteocitos (10,11).

Algunas células hematopoyéticas, bajo la influencia por ejemplo de factores de crecimiento como el TGF β (factor de crecimiento transformante β) o BMP (proteína morfogenética ósea) pueden diferenciarse a células osteoprogenitoras. La presencia de las células osteoprogenitoras en el hueso asegura la existencia de un número adecuado de osteoblastos que mantengan el crecimiento, remodelación y reparación del hueso.

b) Osteoblastos.

Son las células formadoras de hueso. Son células grandes de forma cuboidea, de 20-30 μm de diámetro mayor. Los osteoblastos tienen la función de sintetizar y secretar matriz ósea orgánica (colágeno, proteoglicanos, osteocalcina y osteonectina entre otros). Están localizadas, dispuestas en línea, en la superficie ósea y dependiendo del proceso en que estén implicadas contener o no fosfato cálcico (11). El núcleo suele estar localizado en el polo celular opuesto al hueso recién formado. Los osteoblastos secretan además varias citoquinas y factores de crecimiento que tienen efecto a nivel local sobre la formación y reabsorción de hueso como las interleuquinas 1, 6 y 11. Todas ellas estimulan la formación de osteoclastos. Otros mediadores locales producidos por los osteoblastos son la IGF-I (factor de crecimiento insulínico), prostoglandinas y TGF β (factor de crecimiento transformante β) (12). Son los responsables de secretar el osteoide y mediante las proteínas integrinas se comunican con los osteocitos para regular el metabolismo óseo. Durante la formación ósea un 10% de osteoblastos se transformará a osteocitos mientras que el resto se convertirán en células de revestimiento óseo (o células del endostio o “living cells”) (13).

c) Osteocitos.

Son células maduras responsables del mantenimiento de la matriz ósea, que se ubican en cavidades o lagunas rodeadas por el material intercelular calcificado. Los osteocitos se encuentran comunicados entre sí mediante prolongaciones que se extienden por los canalículos de la matriz vecina. Los osteocitos tienen una morfología variable en función de su edad. Comparten gran parte de las características ultraestructurales de los osteoblastos ya que se originan a partir de osteoblastos atrapados en la matriz ósea recién formada. Esta transformación viene marcada por una disminución del volumen celular y de los organelos celulares implicados en la síntesis proteica. De ahí, que poseen escasa actividad osteogénica siendo esenciales para el mantenimiento de la matriz ósea mediante la comunicación del estado óseo hacia la superficie (células de revestimiento óseo y osteoclastos). El destino final de los osteocitos es el de ser reabsorbidos por los osteoclastos, tras su apoptosis, conjuntamente con el resto de elementos que forman la matriz ósea. De ese modo intervienen mediando en la remodelación y formación del estado óseo (14).

d) Células de revestimiento óseo.

Se originan a partir de osteoblastos que han finalizado la formación ósea. Recubren todas las superficies externas e internas donde no hay actividad de osteoblastos y osteoclastos. Esta capa inactiva se encuentra sobre la matriz osteoide. Su función no está del todo definida pues parecen tener un papel importante en la regulación de la homeostasis ósea equilibrando aposición y reabsorción(15).

e) Osteoclastos.

Su función es reabsorber hueso. Se originan de la célula madre de los granulocitos y macrófagos en la médula ósea; pertenecen por tanto a una línea germinal diferente a la línea de las células osteoprogenitoras, osteoblastos y osteocitos(16). Son células multinucleadas, con citoplasma acidófilo y 100 µm de diámetro y con numerosos lisosomas con enzimas proteolíticas. Su localización más frecuente son las lagunas de Howship, se disponen sobre las superficies óseas de manera aislada o en grupos poco numerosos. Dado que su función principal es la reabsorción de tejido óseo participan de forma determinante en el control de la homeostasis del calcio. Cuando son inducidos por mediadores segregados por los osteoblastos degradan la fracción orgánica de la matriz ósea mediante la producción de dos tipos de enzimas lisosómicas. También son capaces de fagocitar osteocitos, colágeno y el mineral óseo.

1.5. Osteogénesis. Embriología.

La estructura esquelética inicial del embrión está formada por tejido cartilaginoso. Las células que migran alrededor de la notocorda y de la médula espinal forman la columna vertebral. Los condroblastos también forman el cartílago que dará origen a las piezas esqueléticas de las extremidades. El tejido cartilaginoso experimenta crecimiento aposicional exógeno e intersticial endógeno (la aposición de nuevas capas de cartílago tiene lugar en la superficie de la misma).

La formación del esqueleto en el feto tiene lugar de una forma casi paralela a la formación de tejidos blandos a partir de la 5ª semana de gestación con el fin de proporcionarle sostén (17).

La mineralización de la matriz cartilaginosa comienza sobre la 12ª semana de gestación cuando la conformación y organización de los tejidos blandos se encuentra ya muy avanzada.

La formación de los huesos involucra 2 complejos procesos que tienen lugar de forma casi simultánea, la histogénesis del hueso por una parte y su constitución como órgano por otra.

A) La histogénesis del tejido óseo: es la que se inicia a partir de células osteoprogenitoras derivadas de células mesenquimales, que al ser estimuladas por distintos factores, entre ellos las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) o distintos factores de crecimiento, se transformarán en osteoblastos generadores de matriz ósea que formarán las trabéculas óseas sobre las que se depositará el mineral.

B) Su constitución como órgano, lo que incluye el desarrollo del hueso como órgano por un mecanismo de osificación (17).

a.) Osificación.

Existen dos tipos de osificación. (17)

a.1) La osificación membranosa o directa.

La mayoría de los huesos planos se originan de cubiertas membranosas preexistentes. Incluimos aquí los huesos planos de la bóveda craneal, parte de la mandíbula, ilion y la mayor parte de la clavícula. Además se desarrolla a partir de la capa proliferativa del periostio de los huesos largos.

Se forma a partir del tejido conectivo estromal y células mesenquimales indiferenciadas. Se ha demostrado que el mecanismo de osificación membranosa involucra la acción de los factores de crecimiento, BMP -2, 4 y 7 que actúan desde la epidermis de la región, activando en las células derivadas de la cresta neural, un factor de transcripción, el Cbfa-1, el cual transforma las células mesenquimales en osteoblastos. (18)

Estas células se diferencian directamente en osteoblastos y depositan matriz osteoide no mineralizada. Posteriormente se deposita fosfato cálcico y los osteoblastos atrapados se convierten en osteocitos. Finalmente, estos se organizan en láminas concéntricas hasta formar las osteonas.

a.2) La osificación endocondral o indirecta.

Este proceso de osificación se desarrolla a partir de un molde de cartílago preexistente que posteriormente será reemplazado por hueso. Existen centros de osificación primarios que se localizan en las diáfisis de los huesos de las extremidades, vértebras, esternón, costillas, huesos de la base de cráneo y rama mandibular. Además aparecen centros secundarios en las epífisis de huesos largos, platillos vertebrales, etc.

Las células mesenquimales se diferencian a condroblastos. El molde de cartílago que es inicialmente avascular es invadido por vasos sanguíneos y, como consecuencia, los osteoblastos secretan colágeno tipo I. Tras un proceso de maduración los condrocitos, que se han hipertrofiado, mueren por apoptosis y, tras el depósito de las sales de calcio son reemplazados por hueso trabecular. Todo este proceso está regulado por la hormona del crecimiento (GH) y por el factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 y 3 (FGF-2, FGF-3) entre otros.

Se origina pues, internamente una población proliferativa de condrocitos que expresan colágeno tipo II y más periféricamente de células pericondrales que expresan colágeno tipo I. Posteriormente, los condrocitos salen del ciclo proliferativo, se hipertrofian y empiezan a sintetizar colágeno tipo X en vez de II. Esta capa de cartílago hipertrófico forma una malla de colágeno tipo X, que se reabsorbe más fácilmente que el colágeno tipo II y posteriormente será reemplazada por tejido óseo.(19)

La invasión vascular del cartílago aporta células mesenquimales que evolucionan a osteoblastos. Se producen láminas a razón de $1\mu\text{m}/\text{día}$.

1.6. Tipos De Hueso Según Estructura.

Existen dos tipos de hueso según su estructura: hueso fibrilar, inmaduro o hueso primitivo y hueso laminar o maduro.

a) Hueso fibrilar, inmaduro o hueso primitivo.

Se encuentra extensamente en el embrión y niños menores de 2 años, localmente en la zona de osificación de la placa fértil (metáfisis) de huesos en crecimiento y en fase de formación de callos de fractura.

Está formado por una tasa de celularidad cuatro veces mayor por unidad de volumen que el hueso laminar, distribuidas de forma irregular, fibras colágenas y focos de mineralización dispersos.

En este tipo de hueso, no es distinguible el hueso cortical y el hueso trabecular.

Tiene un comportamiento biomecánico específico: es isótropo lo que significa que presenta las mismas características biomecánicas en todas direcciones del espacio. Por este motivo es más frágil aunque es flexible y fácilmente deformable.

b) Hueso laminar o maduro.

Este tipo de hueso predomina en el esqueleto postnatal. A diferencia del hueso inmaduro, se caracteriza por presentar menor densidad celular. Existe un predominio de la matriz ósea con mineralización homogénea y una disposición de esta siguiendo el patrón en capas ordenadas y paralelas de fibras de colágena.

El hueso laminar tiene un comportamiento biomecánico anisótropo y sus propiedades dependen de la relación entre la dirección predominante de sus microestructuras y la dirección de la fuerza aplicada. (17)

El paso de la isotropía (hueso inmaduro) a la anisotropía (hueso maduro) a nivel biomecánico está determinado por estímulos mecánicos, para conseguir la mayor eficacia con la menor masa de material según las cargas que predominen. Se basa en la Ley de Wolff que formuló en 1892. Esta formula que la orientación y dimensión de cada trabécula depende de las fuerzas que soporta (17).

A su vez, este hueso maduro presenta 2 zonas diferenciadas tanto microscópica como macroscópicamente:

b.1) Cortical.

Presenta una estructura densa y compacta que forma la superficie de huesos planos y largos, en su diáfisis. La unidad estructural es la osteona de Havers.

El osteocito se aloja en lagunas, rodeado de capas concéntricas de hueso, a una media de 100 μm de distancia de un capilar.

Histológicamente se acepta que presente un 80% de masa ósea con un 30% de porosidad. Su densidad es de 1,85g/cm².

Se trata por tanto de un hueso más rígido, menos dúctil, y más quebradizo ante fuerzas de carga transversas. Es una zona capaz de absorber energías relativamente altas antes de romperse (17).

b.2) Esponjosa.

Se trata de una estructura abierta que comprende trabéculas, espículas y espacios huecos ricos en vasos sanguíneos. Esta formación predomina en epífisis y metáfisis de huesos largos y en huesos cortos. Los osteocitos se hayan en la superficie de las trabéculas.

Histológicamente hayamos un 20% de masa ósea con un 50-90% de porosidad.

Su densidad es de 0,2-0,4 g/cm². El complejo trabéculas-espacios-vasos forma la médula ósea.

Es un tipo de hueso que sometido a fuerzas de compresión, las trabéculas tienden inicialmente a un comportamiento elástico, deformándose sin ceder ni transmitir las fuerzas a las estructuras óseas adyacentes (17).

BLOQUE II

2. ESTADO ACTUAL DE LA INGENIERÍA TISULAR DEL TEJIDO ÓSEO.

La ingeniería tisular (TE) es una ciencia multidisciplinaria que aplica los principios y métodos de la ingeniería de materiales y la biología molecular hacia el desarrollo de sustitutos que produzcan, reparen, mejoren o restauren la función biológica de un tejido u órgano dañado con la ayuda de células, matrices y sustancias que las comuniquen.

El termino ingeniería tisular ha sido definido por la Nacional Science Foundation como “La aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el entendimiento fundamental de la relación entre estructura y función de tejidos normales y patológicos para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la actividad de los tejidos u órganos perdidos o dañados” (20).

En el campo de la regeneración ósea el mejor sustituto óseo hasta la fecha es el injerto autólogo que hueso esponjoso, pero su obtención está limitada en muchos casos por el tamaño del defecto y por la morbilidad asociada para el paciente como son la presencia de cicatrices posibilidad de infecciones en la zona donante o incluso fracturas de estrés (21). La ingeniería tisular del tejido óseo, pretende dar respuesta y una alternativa de

tratamiento al injerto óseo autólogo en los casos en los que sea necesario, haciendo de la misma una disciplina emergente.

Para generar nuevos tejidos la Ingeniería Tisular, tal y como se ha comentado previamente, se basa en 3 pilares necesarios, del mismo modo que un edificio: células con capacidad de diferenciación y replicación, que equivaldrían a las personas habitantes y constructoras del edificio, matrices extracelulares o *scaffolds* que corresponden al armazón, y factores de crecimiento o materiales empleados como cemento, escayola o pintura.

3. COMPONENTES.

3.1 Componentes Celulares.

A.) CÉLULA MADRE (CM). DEFINICIÓN.

Las células madre o stem cells son células indiferenciadas que tiene capacidad para autorrenovarse, de ser clonogénicas y poder diferenciarse a diferentes estirpes celulares (22-24). Las CM pueden clasificarse en función de su origen (embrionario o del adulto), el tejido en que se asientan, o su potencial de diferenciación. Siendo esta última la clasificación más usada.

Las CM totipotentes es el óvulo fertilizado y progenia de las dos primeras divisiones. Son las únicas CM que puede dar lugar a un embrión y por tanto un individuo completo.

Las CM pluripotentes son células capaces de generar los aproximadamente 200 tipos de tejido de un humano, pueden formar células de cualquiera de las tres capas del embrión pero no los tejidos extraembrionarios. Denominamos CM multipotentes, las que sólo pueden dar lugar a un subconjunto de tipos celulares; CM oligopotentes, cuando este subconjunto es más reducido (una definición un tanto arbitraria); o CM unipotentes, si sólo pueden generar un tipo celular (22,25,26).

El destino de una CM depende fundamentalmente de factores epigenéticos, así como de señales e influencias de su microambiente, ya sea mediadas por factores solubles o por el contacto directo con sus células vecinas y la matriz extracelular, es decir, de su nicho (27,28).

B.) CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (CME).

Se denominan CME (Células madre embrionarias) y se obtienen de la masa interna del blastocisto de un embrión humano de 5 a 7 días. En este período, el embrión todavía no ha formado las 3 capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), por lo que estas células conservan su totipotencialidad (28).

Las CME tienen una alta actividad metabólica y proliferativa asociadas con la activación de un gran número de factores de transcripción (29) y con un alto contenido en telomerasa (30).

Tras su estimulación “in vitro”, estas células son capaces de diferenciarse por ejemplo en islotes pancreáticos, sangre, músculo, nervio, o células del hígado. En modelos murinos se han diseñado técnicas de cultivo para mantener su pluripotencialidad, su capacidad de autorrenovación y para determinar su diferenciación en un tejido concreto (31). Dado que las CME recapitulan “in vitro” el desarrollo embrionario, los modelos murinos son una valiosísima fuente de información sobre aspectos básicos de la biología celular y del desarrollo en sus etapas iniciales (32, 33). Así, mediante técnicas de recombinación homóloga (proceso por el que se pueden alterar directamente determinados sitios del genoma) se han identificado los programas genéticos responsables del desarrollo hacia líneas celulares concretas. Por otra parte, analizando el efecto de la modificación de un determinado gen en la formación de líneas celulares específicas, las CME proporcionan una herramienta para identificar potenciales dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevas moléculas farmacológicas.

Recientes avances técnicos han permitido la producción de líneas de CME humanas disponibles para investigación (34-35). Estudios preliminares han demostrado que existen diferencias sustanciales con las CME murinas tanto a nivel fenotípico y genómico como en su comportamiento in vitro, y que estamos aún lejos de poder manejar con seguridad y eficacia su eventual potencial terapéutico (36, 37). Sin entrar en el terreno de la bioética, y de si está o no justificado el empleo de embriones humanos con finalidades terapéuticas, el uso clínico de CME se enfrenta a dos principales limitaciones todavía no resueltas. Una es la capacidad para generar teratomas cuando se implantan en individuos adultos. El otro inconveniente es que ningún adulto tiene sus propias células embrionarias disponibles para su uso terapéutico, por lo que hay que recurrir a células de embriones alogénicos y, por tanto, no histocompatibles, con todas las limitaciones de los trasplantes de órganos (necesidad de inmunosupresión, etc.)(22).

Transferencia nuclear somática para la obtención de CME.

Esta técnica fue mundialmente conocida a raíz de la oveja “Dolly” (38, 39). Los investigadores aislaron el núcleo de una célula somática de un animal adulto y lo inyectaron en un ovocito al que previamente se le había extraído su propio núcleo. Este nuevo ovocito manipulado, tras ser artificialmente activado, fue implantado en el útero de una hembra huésped, donde se desarrolló de forma natural originando un individuo normal, idéntico al que donó el núcleo celular (clonación reproductiva). Cuando la transferencia nuclear somática se emplea para obtener líneas de células stem embrionarias autólogas en cultivo para terapia celular, entonces se denomina clonación terapéutica. En este caso, el núcleo de una célula somática del paciente, se transfiere al ovocito enucleado de una donante y las células de la

masa interna del blastocisto obtenido, que mantienen las características de pluripotencialidad de las células embrionarias, se extraen y se cultivan “in vitro”. Posteriormente se induce su diferenciación hacia el tejido concreto que se precisa reparar. En contraste con las CME convencionales, las CME obtenidas por clonación terapéutica son genéticamente idénticas a las del paciente, y no producen rechazo inmunológico (40, 41).

No obstante, aparte del problema ético que lleva ligado este tipo de técnica, se ha podido comprobar que los animales resultantes de esta técnica, aunque de apariencia normal, presentan a veces efectos secundarios patológicos posiblemente debidos a una incorrecta reprogramación epigenética (40, 41).

C.) CÉLULAS MADRE PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS (IPS).

Son células que en sus orígenes no eran embrionarias, pero tras la inducción se comportan como tal. Estas células fueron descubiertas en el año 2006 y ha supuesto un nuevo enfoque en la Terapia celular (42), ya que se podría disponer de células con características totipotenciales sin tener que manipular o destruir embriones. Además, a diferencia de las CME, con las IPs cabría la posibilidad de realizar trasplantes autólogos en los pacientes evitando los problemas de rechazo. Estas células son morfológicamente similares a las CME, expresan genes y antígenos de superficie celular idénticos, tienen capacidad de diferenciarse in vitro a otros linajes celulares y tienen capacidad de formar teratomas cuando se trasplantan en ratones inmunodeprimidos. La única diferencia es que no proceden de embrión (39).

Takahashi K. y cols. (42) fueron los primeros en conseguir IPs con la inserción de 4 genes al núcleo de fibroblastos de ratón. Los genes utilizados

fueron Oct4, Sox2, c-Myc, y Klf4. Este hallazgo ha sido posteriormente confirmado por diferentes investigadores en el mismo modelo animal, (43-48). La reprogramación celular también se ha realizado con éxito en células humanas, tras la inserción de los genes Oct4, Sox2, Nanog and Lin2829,(46-53). Más recientemente la técnica se ha refinado, hasta el punto que se han obtenido IPs con los genes Oct4 y Sox241.

No obstante, deben seguir realizándose más experimentos que puedan confirmar la seguridad de estas células para su aplicación clínica, de tal modo que estemos seguros de que no existan cambios en el cariotipo a lo largo de su cultivo (49), errores en la reprogramación de factores de transcripción o déficit de telomerasa (54,55).

D.) CÉLULAS EMBRIONARIAS DE CARCINOMA (ECC).

Las células madre embrionarias de carcinoma (ECC, del inglés Embryonic Carcinoma Cells) son células que provienen de teratocarcinomas (tumores gonadales). Son similares a las células madre embrionarias germinales (EGC), los precursores de las células germinales, pero en el estadio adulto son pluripotenciales. Aunque se comenzó a investigar con ellas, se han buscado otras fuentes alternativas debido a que muestran aberraciones cromosómicas y pierden su capacidad de diferenciarse in vitro si no se añaden numerosos factores (56-59).

E.) CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS GERMINALES Y FETALES.

Este tipo de células consideradas pluripotenciales, tienen la capacidad de generar cualquier tipo de célula, somática o germinal, pero no las extraembrionarias. Este tipo de células provienen de embriones más desarrollados. Se aíslan de precursores germinales obtenidos de primordios gonadales de un embrión post-implantacional. Tienen una gran proliferación y diferenciación como las ECC pero, en contraste con estas, no forman teratomas al implantarlas en ratones inmunodeprimidos (60, 61). Las células madre fetales en cambio son multipotentes y sólo pueden dar tipos celulares presentes en el propio tejido. Son más fáciles de obtener que otras, pero conforme avanzan los pases en cultivo se vuelven senescentes, de tal modo que necesitan immortalizarse para no perder su capacidad (62-64).

F.) CÉLULAS MADRE ADULTAS (CMA).

Estas células son consideradas también multipotentes (65-69). Según las teorías del desarrollo hasta ahora admitidas, el potencial de diferenciación de las CMA está restringido a la capa embrionaria de la que proceden (62). La programación de las CMA parece producirse durante el desarrollo embrionario y se perfila dentro del tejido en el que se asientan, de modo que fabrican, por defecto, las células de dicho tejido. Así, las CM de la piel sólo podían dar lugar a piel, y las del hígado sólo generaban hepatocitos. Se cree que existen en casi todos los tejidos este tipo de células pero en proporciones muy pequeñas. Estas células son componentes esenciales en la hemostasia tisular, ya que se encargan del remplazo de células senescentes y de recuperar la función tras enfermedades o traumas. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas de médula ósea regeneran continuamente todas las células sanguíneas y del sistema inmunitario (70).

Plasticidad de las células madre adultas.

A finales de los años 90, varios grupos de investigadores (71) reportaron actividad hematopoyética a partir de células del sistema nervioso central y del músculo esquelético. La infusión de CM neurales obtenidas en cultivos “in vitro” (neuroesferas) y de CM miogénicas purificadas del músculo esquelético, conseguían reconstituir la hematopoyesis en ratones irradiados letalmente. Estos experimentos demostraban una versatilidad previamente no reconocida en las CMA acuñándose el concepto de “plasticidad”. Se define como tal la propiedad de las CMA de diferenciarse en tejidos de otra capa embrionaria, adoptando los perfiles de expresión fenotípica y funcional específicos de dichos tejidos. Estudios posteriores muy rigurosos han mostrado claras discrepancias con respecto a la “plasticidad”: algunos han sido incapaces de validar los resultados originales y sugieren que la actividad hematopoyética observada en los tejidos no hematopoyéticos depende exclusivamente de células madre itinerantes, procedentes de la médula ósea (CD45+) (72, 73). Otros, por el contrario, han confirmado el potencial hematopoyético de células CD45 negativas procedentes de tejidos postnatales no hematopoyéticos (74,75). Con todo, los trabajos de mayor interés son aquellos que sugieren una mayor plasticidad de las CM procedentes de la médula ósea o de la sangre periférica (76). Existen resultados satisfactorios con células adultas que avalan su utilización para terapia celular en enfermedades neurodegenerativas, enfermedades de cartílago y hueso, lesiones del corazón (regeneración de tejido infartado) y enfermedades hematológicas (77-84).

Nichos de células madre adultas.

El concepto de “nicho” de células fue introducido por primera vez por Schofield en 1978, y comprende todo los elementos que rodean a la célula madre cuando se encuentra en su estado nativo, incluyendo el resto de células que puedan estar en contacto directo con ellas, así como la matriz extracelular y las moléculas solubles que se encuentran localmente (85). En los mamíferos se han caracterizado nichos correspondientes a células madre de la médula ósea, diente, piel y folículo piloso, intestino y sistema nervioso entre otros (86-92).

3.2 Las Células Osteoprogenitoras.

En lo que concierne a la naturaleza de las células a implantar, hoy día los estudios van dirigidos a la utilización de células estromales mesenquimales adultas seleccionadas a partir de la medula ósea. Estos aspectos han sido desarrollados desde hace más de 15 años y han mostrado que su implantación mejora la capacidad osteoformadora de los sustitutos de los injertos óseos (93). Desde hace varias décadas, es sabido de la capacidad osteogénica de los injertos o trasplantes de medula ósea total después de su implantación ectópica (fuera del hueso). Numerosos estudios clínicos han mostrado que la medula ósea posee un fuerte potencial osteogénico gracias a sus líneas mesenquimales que son origen de las líneas osteoblasticas y osteocíticas responsables de la formación ósea (94).

Fue a partir de la década de los 60-70 cuando surgió el concepto de ingeniería de tejidos, al constatarse el potencial osteogénico de la medula ósea autóloga asociada a autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos en estudios realizados tanto en modelo animal como en humanos, cuando se aplicaron a defectos óseos secundarios a pseudoartrosis, resecciones tumorales benignas y defectos postraumáticos. En esos momentos la tasa de curación obtenida en pérdidas de sustancia era del 77%, resultados similares a los obtenidos con el empleo de injerto óseo esponjoso autólogo (95).

La asociación de médula ósea total y cerámicas de fosfato cálcico han sido ampliamente estudiadas. Ohgushi y cols. (96) obtuvo neoformación ósea después de implantar en modelo animal cerámicas porosas y médula ósea total en lugares ectópicos, ampliando su estudio a la reparación de defectos óseos creados en ratas. Por la misma época, Chapman y cols. (97) publicó un estudio clínico prospectivo en humanos realizado sobre 249 fracturas en donde comparó la aplicación de autoinjertos esponjosos autólogos con el compuesto cerámica porosa-colágeno asociada a médula ósea total, obteniendo una tasa de consolidación idéntica pero con una tasa de complicaciones infecciosas significativamente superiores en el grupo de autoinjertos. Justificando su uso por su eficacia, bajo riesgo infeccioso, menor morbilidad, menor duración del acto quirúrgico y menor estancia hospitalaria.

Posteriormente entre los años 2000-2003, diversos estudios se han realizado añadiendo a la asociación antes mencionada, proteínas osteoinductoras de la diferenciación celular como la familia de las proteínas morfogenéticas humanas (BMP-2, BMP-4, BMP-7), mejorando los resultados de los autores anteriores cuando se aplicaron tanto en lugares ectópicos como en defectos óseos (98).

A.) La Médula ósea como fuente de células osteoprogenitoras.

Desde hace dos décadas, la inyección aislada de medula ósea total fresca autóloga ha sido aplicada tanto en el tratamiento de la necrosis avascular de cabeza femoral (NACF) como para conseguir la consolidación de pseudoartrosis atróficas de tibia (99). Una mejora sustancial en este procedimiento ha surgido con la posibilidad de aislar elementos celulares no deseables de la medula ósea (polimorfonucleares y células anucleares) para finalmente obtener un concentrado de células mesenquimales para su posterior aplicación en la lesión o defecto óseo a reparar.

En el área maxilofacial, la incorporación de la terapia celular ha sido mucho más reciente como en casos de elevación de seno maxilar, reparación de defectos alveolares óseos y reparación de cóndilo mandibular. La posibilidad técnica de poder aislar células mesenquimales de la médula ósea ha abierto la posibilidad de su aplicación en otras patologías en donde se detecte un fracaso en el proceso de regeneración ósea sin un posible tratamiento alternativo. Éste es el caso de la Osteonecrosis Maxilar (ONM), con una localización anatómica especial como es la mandíbula, que presenta muy poca vascularización y como consecuencia la dificultad para activar la cascada de reparación ósea. De ahí que recientemente se haya intentado realizar de forma aislada la utilización de células mesenquimales en ONM secundaria a la ingesta de pamidronato (100). Todos los estudios, tanto en animal de experimentación como en humanos, citados anteriormente, sugieren fuertemente que la medula ósea posee un alto nivel de osteogenicidad, ya sea utilizada en lugares ectópicos como ortotópicos, sea aplicada de forma aislada o en asociación con matrices porosas naturales o de síntesis, autoinjertos, aloinjertos, matriz ósea desmineralizada y xenoinjertos desproteinizados, permitiendo su uso de modo fiable y seguro para el paciente.

B.) Células madre mesenquimales (MSC).

El interés de la comunidad científica por estas células con los hallazgos de Friedenstein y cols. (101) y Trassoli y cols. (102), cuando implantaron médula ósea total de ratón bajo la cápsula renal de ratón con la misma carga genética. Estos implantes produjeron neoformación ósea en el 75% de los casos. Concluyendo que la médula contiene precursores celulares osteogénicos determinados (pre-osteoblastos) y que no necesitan factores de inducción. El cultivo de médula ósea total proporciono células adherentes que formaron colonias (CFU-F) y estas después de varios pases, mostraron su capacidad después de su trasplante in vivo, de generar al menos 5 tipos de tejidos diferentes, tejido óseo, adiposo, cartilaginoso, fibroso y estromal. De modo que estas CFU-F constituían una línea natural mesenquimal diferente a las líneas hematopoyéticas, demostrando que estas células una vez implantadas en lugares ectópicos son el origen del tejido óseo neoformado.

Hoy día, sabemos que entre las células estromales adheridas existen una población de células germinales o madre adultas denominadas “células madre o troncales mesenquimales” (MSC), que a su vez tienen la capacidad de proliferación, autorreplicación y diferenciación (103). Su presencia es escasa pues representa el $1/10^5$ de las células mesenquimales de la médula ósea total, motivo por el que para su aplicación en clínica humana en casos de NACF, precisa de dispositivos capaces de concentrarlas para seguidamente ser implantadas al defecto óseo a reparar. Trabajos realizados “in vitro” han mostrado que pueden derivar, después de una fase de proliferación, en múltiples vías de diferenciación para dar lugar a

osteoblastos, osteocitos, condrocitos, mioblastos, fibroblastos y adipocitos. En particular, estas se diferencian en la vía osteoblástica en presencia de un medio osteogénico que contenga ácido ascórbico, dexametasona y β -glicerofosfato. Todas estas características han permitido considerar su empleo en procesos de regeneración ósea, cartilaginosa, tendoligamentaria y muscular.

C.) Efecto osteogénico de las células mesenquimales (MSC).

El efecto osteogénico de las MSC puede ser medido “in vivo” después de su implantación en lugares ectópicos u ortotópicos. Los modelos de implantación ectópicos, subcutáneo o intramuscular, han permitido comparar las propiedades de numerosos biomateriales y, en particular, analizar su influencia sobre la formación ósea de su composición química, del tamaño y densidad de los poros y del grado de interconexión entre ellos (102, 103). Goshima y cols. (104), fue de los primeros en demostrar que la asociación de células estromales de ratas singénicas y una cerámica bifásica de fosfato cálcico posee un fuerte poder osteogénico al observar el desarrollo de tejido óseo en el interior de los poros después de su implantación subcutánea. Un año después, Dennis y cols. (105). En un ensayo similar, mostró igualmente un mayor potencial osteogénico si se asociaba fibronectina y laminina a la cerámica. A partir de esos momentos nuevos trabajos se han realizado para comparar la osteogenicidad de diversas matrices asociadas a MSC humanas cuando son aplicadas en defectos óseos (106).

D.) Matrices o substratos.

La mayoría de los tejidos y órganos requieren de una estructura tridimensional en la cual estén inmersas las células. En el caso de los tejidos artificiales generados en el laboratorio, esta estructura tridimensional o de soporte se denomina matriz extracelular, andamio o *scaffold*. La función principal de esta matriz extracelular artificial debería ser similar a la de la matriz extracelular natural, por una parte, sirve como de armazón, pero permitiendo la proliferación y la diferenciación de las células que están localizadas dentro de ella (107).

La ingeniería tisular permite la fabricación de estas matrices extracelulares mediante diferentes tipos de biomateriales. Los biomateriales deben por ello cumplir ciertos requisitos básicos, entre ellos: ausencia de toxicidad y de potencial carcinogénico, biocompatibilidad, y tolerancia a la esterilización previamente a su uso. Además de esto, deben contar con propiedades biológicas, físicas y mecánicas como la permeabilidad, estabilidad, elasticidad, flexibilidad y plasticidad que permitan fabricar diferentes formas, bien sea, láminas, geles, o estructuras tridimensionales sólidas (108).

Estos biomateriales, deben poseer propiedades biológicas adecuadas que permitan la adhesión celular y la activación de los diferentes factores de crecimiento (109).

El injerto óseo, en especial el injerto óseo esponjoso autólogo, está considerado como el material de elección para obtener una verdadera reconstrucción ósea. Pero la técnica de obtención presenta una serie de

desventajas relacionadas con la morbilidad para el paciente (cicatrices dolorosas, infecciones locales, hernias musculares, fracturas de estrés, incremento estancia hospitalaria, etc.). Existe una abundante evidencia preclínica de que el autoinjerto óseo puede ser sustituido por un producto de ingeniería tisular celular constituido por células mesenquimales autólogas de médula ósea (MSC), una matriz porosa de fosfato tricálcico (FTC) y matriz ósea desmineralizada (MOD) (96-98).

Las matrices se clasifican, según su origen, en naturales, basadas principalmente en proteínas y polisacáridos (colágeno, fibrina, alginato, ácido hialurónico,...)(110,111); y en sintéticas las cuales se pueden clasificar en cuatro grupos principales: metales, polímeros, cerámicas y compuestos o composites.

Los biomateriales naturales cumplen las funciones físicas y biológicas requeridas de permitir crecimiento y diferenciación celular pero tienen el riesgo de que en ellos se puede producir la transmisión de patógenos, al emplearse material bovino, equino... y presentan una rápida degradación (112).

Se han dado utilidad como *scaffold* al colágeno, pero es necesario un mayor control del estudio de la biodegradabilidad (113,114). La fibrina presenta unas muy buenas propiedades biológicas, pero sus propiedades mecánicas son bajas, para su aplicación como *scaffold* en regeneración ósea y al igual que el colágeno, presenta una rápida degradación. La matriz ósea desmineralizada presenta unas estupendas propiedades biológicas ya que es osteoinductora, al poseer factores de crecimiento pero presenta una biodegradabilidad igualmente alta (115, 116, 117).

En cuanto a los biomateriales sintéticos, éstos presentan la ventaja de que son fáciles de obtener, sus propiedades mecánicas son controlables, se evita la transmisión de patógenos pero sus propiedades biológicas son peores, siendo necesario en muchos casos añadir otros productos o moléculas que permitan una correcta proliferación y diferenciación celular (118).

Los biomateriales empleados en la regeneración ósea son frecuentemente de tipo sintético, en concreto, cerámicos como la hidroxiapatita (HA) y fosfatos de calcio en general. Estos se caracterizan por presentar una composición química parecida al componente mineral del hueso, propiedades mecánicas similares a las óseas y disponer de propiedades biológicas adecuadas.

El material cerámico más utilizado en la actualidad es la hidroxiapatita que está compuesta de un fosfato de calcio cristalino $((Ca_{10})(PO_4)_6(OH)_2)$. Este material en realidad es el componente mineral principal de los huesos y puede ser sintetizado de forma artificial pero manteniendo una estructura muy similar a la que forma parte del tejido óseo de modo que presente características de osteoconductividad (119, 120).

Tras estudiar la osteoconductividad, diversos estudios como los de Okumura (121) y Martínez (122) demostraron cómo la osteogénesis empieza en la superficie de los poros de la hidroxiapatita y crece en el espacio disponible entre estos poros. El tamaño del poro ideal ha de ser entre 100 nm y 500 nm. La biodegradación del material, si es empleado en la regeneración ósea, ha de ser muy lenta (123) y su principal desventaja es que sus propiedades mecánicas de forma aislada son bajas.

Otro material sintético son los polímeros, el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), y su copolímero poli DL- ácido láctico - ácido glicólico (PLGA) Estos son materiales biodegradables pero presentan una desventaja importante, al implantarlos in vivo provocan una liberación de subproductos ácidos que son responsables del desencadenamiento de una reacción inflamatoria (124).

Por ultimo, se encuentra el desarrollo de compuestos o composites como *scaffold* sintético, esto es mezcla de cerámica y polímeros, de modo que la combinación de ambos mejora las propiedades mecánicas y biológicas de sendos materiales (125,126).

En la tabla 1 se observa un resumen de los diferentes biomateriales y sus aplicaciones.

Composición	Tipo	Origen	Aplicaciones clínicas	Propiedades
Colágeno	Proteína	Natural	Regeneración piel, tejidos blandos, cartílago y hueso.	Biodegradable
Fibrina	Proteína	Natural	Reparación de tejidos duros y blandos	Biodegradable
Matriz ósea desmineralizada	Proteína	Natural	Relleno de defectos óseos, regeneración de cartílago	Biodegradable, fuente natural de proteínas osteoinductivas (BMPs)
Fosfatos de calcio Ej.: hidroxiapatita, fosfato tricálcico, fosfato de octacalcio	Cerámico	Sintético	Relleno de defectos óseos	Osteoconductor, adhesión de tejido óseo, biodegradable a largo plazo.
Ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), y copolímero poli DL- ácido láctico - ácido glicólico (PLGA)	Polímero	Sintético	Regeneración piel, tejidos blandos, cartílago y hueso.	Biodegradable

Tabla 1. Materiales para implantes óseos. Extractado y adaptado de Ikada (123)

3.3 Factores De Crecimiento.

Los factores de crecimiento son un tipo de citoquinas de naturaleza proteica que son segregadas por células y cuya función es la comunicación intercelular. De forma que al unirse el factor de crecimiento a su receptor celular en este inicia diferentes acciones como la estimulación o inhibición de la adhesión celular, la proliferación, la diferenciación o la migración de la célula.

Los factores de crecimiento son junto con las matrices o *scaffold* y las células, los tres elementos necesarios para que se produzca la regeneración de cualquier tejido incluido el óseo (127).

El hueso tiene una gran cantidad de factores de crecimiento, los más importantes son: las proteínas morfogenéticas o BMPs, el factor de crecimiento fibroblástico o FGFs, el factor de crecimiento insulínico o IGF, los factores de crecimiento derivados de plaquetas o PDGF, el factor de crecimiento transformante β , el factor de crecimiento transformante β o TGF β y el factor de crecimiento vascular endotelial o VEGF. (77)

Las BMPs son proteínas con gran capacidad osteoinductiva descritas por primera vez por Urist en 1965 (128). Hay una veintena de BMPs descritas hasta la fecha aunque las que presentan mayor capacidad osteoinductora son de la 2 a la 7. (129) Las BMPs generalmente se encuentran en la matriz ósea y su función es estimular a las MSC a que migren y se diferencien a osteoblastos (129, 130).

Los IGF es molecularmente similar a la hormona insulina, de ahí su nombre. Se encuentran en múltiples tejidos del organismo como en músculo, hígado, hueso y piel. En el hueso se sabe que favorecen la síntesis de colágeno tipo I e intervienen en la diferenciación osteoblástica (131).

El VEGF es una proteína implicada sobretudo en la angiogénesis. Se expresa igualmente en una amplia variedad de tejidos incluido en los focos de fractura. Tiene la capacidad de inducir la angiogénesis y parece tener efecto sobre las células osteoprogenitoras, favoreciendo que aumente la mineralización ósea. (132,133).

Los FGFs, son otras citoquinas implicadas en la reparación de tejidos blandos y duros favoreciendo la epitelización, diferenciación celular y fomentando igualmente la angiogénesis. La FGF-2 se sabe que presenta un papel regulador del metabolismo óseo, tanto en la formación como en la reabsorción (134).

El TGF β el factor de crecimiento transformante β son un grupo de factores de crecimiento que intervienen sobretudo a nivel óseo en la regulación y estimulación de la diferenciación celular de las MSC's a condrocitos, osteoblastos o osteoclastos (135).

El PDGF está producido por osteoblastos, plaquetas y monocitos. Se encuentran sobretudo en las primeras fases de curación del foco de fractura estimulando la proliferación y migración de MSC a la herida (136, 137).

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Objetivos

Hipótesis de trabajo.

Las actuales técnicas de regeneración ósea constituyen un procedimiento quirúrgico válido para aumentar la cantidad y la calidad de hueso en áreas con insuficiente volumen óseo. A su vez, la combinación de su uso junto con el de la terapia celular puede resultar en un salto cualitativo a la hora del tratamiento de patologías que cursan con destrucción ósea.

El cultivo de células mesenquimales en fosfato tricálcico junto con matriz ósea desmineralizada para la estimulación de la regeneración ósea, combina las propiedades osteogénicas, osteoinductivas y osteoconductoras del biomaterial a las células madre permitiendo mayor y mejor regeneración ósea. Como primer paso para demostrarlo nos planteamos evaluar su seguridad y por ello se plantea la siguiente hipótesis:

El constructo formado por un células mesenquimales cultivadas en fosfato tricálcico y mezcladas con matriz ósea desmineralizada es seguro en animales.

Objetivos.

Para verificar esta hipótesis de trabajo, nos planteamos los siguientes objetivos:

General.

El objetivo principal de estudio es evaluar la seguridad y valorar la eficacia del constructo células mesenquimales cultivadas en fosfato tricálcico y mezcladas con matriz ósea desmineralizada (FTC+MSC+MOD) implantado en ratones inmunodeprimidos NOD/SCID.

Específicos.

Estudiar la toxicidad aguda y crónica del implante FTC+MSC+MOD en modelo murino NOD/SCID.

Estudiar la biodistribución del constructo FTC+MSC+MOD implantado en modelo murino NOD/SCID, con especial atención al anidamiento óseo.

Valorar si hay formación de tejido óseo en el lugar del implante en el ratón NOD/SCID del constructo FTC+MSC+MOD frente al grupo control.

Valorar a partir de que momento se observa formación ósea en el lugar del implante en el ratón NOD/SCID del constructo FTC+MSC+MOD.

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Material y Método

1. Obtención de las Células Madre Mesenquimales (MSC).

1.1 Selección de donantes.

Las MSC humanas fueron obtenidas de donantes altruistas mayores 18 años de ambos sexos. Se seleccionaron aquellos pacientes de la lista programada quirúrgica del Servicio de Traumatología, que iban a ser sometidos a cirugía por algunos de los siguientes motivos: fractura por traumatismo de alta energía, patología ligamentosa o de menisco en rodilla o cualquier otra intervención que fuera a realizarse bajo anestesia para no causar morbilidad al donante durante la extracción de la médula ósea. Se utilizaron 4 donantes distintos.

Nuestro estudio forma parte de la preclínica del Ensayo clínico (EC11-009 ENSAYO CLÍNICO EN FASE I DE UTILIZACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA AUTÓLOGAS SEMBRADAS SOBRE MATRIZ POROSA DE FOSFATO TRICÁLCICO Y MATRIZ OSEA DESMINERALIZADA EN PACIENTES CON OSTEONECROSIS MAXILAR.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (Anexo 1).

1.2 Consentimiento informado.

Todos ellos firmaron el correspondiente consentimiento informado para la donación de médula ósea que incluía la concesión del excedente de muestra al biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Biobanc Mur) para su uso en investigación (Anexo 2).

1.3 Obtención de médula ósea humana.

La médula ósea fue obtenida por el Servicio de Hematología en los quirófanos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca en Murcia (España) mediante la técnica mini-harvest: Bajo anestesia general, con el paciente colocado en decúbito prono y en condiciones de esterilidad, se realiza la palpación de la espina iliaca posterosuperior seleccionada y se infiltra anestesia local con mepivacaína (6-8 ml) mediante punción con aguja intramuscular. A continuación se procede a la punción con trócar de aspirado de médula ósea en la espina iliaca posterosuperior. Tras atravesar el periostio se retira el fiador y se conecta una jeringa de 10 ml heparinizada previamente con 0.5 ml de heparina sódica al 5% (Mayne Pharma®, España). Se realiza la aspiración de médula ósea, con la premisa de no obtener más de 2-3 ml en cada aspiración para asegurar una buena celularidad medular y la mínima contaminación con sangre periférica en la muestra obtenida. El volumen de médula ósea recolectado fue de 10 ml en cada donante. Posteriormente, tras colocar un tapón estéril a las jeringas, se llevaban al laboratorio de Terapia Celular para su procesamiento.

2. Aislamiento y cultivo de Células Madre Mesenquimales (MSC) de médula ósea.

La jeringuilla de 10 ml con la médula ósea aspirada se procesó en una campana de flujo laminar según el siguiente procedimiento:

1. Se coloca en una gradilla 2 tubos falcon de 50 ml.
2. Se agitan suavemente la jeringa y se vierte el contenido de todas en el tubo Falcon.
3. Con una jeringa de 1ml y aguja de 21G, se toman 400 μ l de la muestra para realizar test de esterilidad según PNT-CC-004 inoculando 200 μ l en cada Bact-Alert. El sistema Bact-Alert consta de dos medios: Aeróbicos; que permite el crecimiento de bacterias aeróbicas, microaerófilicos, bacterias fastidiosas, levaduras comunes. Y anaeróbicos: que permite el crecimiento de bacterias anaeróbicas. Esta técnica se lleva a cabo en el Servicio de Microbiología del HCUVA por personal cualificado.
4. Se añade el mismo volumen de DPBS a la médula ósea del falcon de 50 ml.
5. Se coloca un tamiz de Nylon de 100 μ m en el otro Falcon de 50 ml.
6. Se filtra la médula diluida vertiéndola a este segundo Falcon a través del tamiz y se homogeneiza con pipeta serológica de 5 ml suavemente.
7. A continuación se llenan con 5 ml de Ficoll 2 tubos Falcon de 15 ml, teniendo en cuenta que la proporción para hacer el gradiente de densidad con el Ficoll será 1:2 (ficoll: médula ósea diluida). Y se deposita cuidadosamente el Ficoll sin rozar las paredes del tubo con una pipeta serológica de 5 ml.

8. Se añade, 10 ml de médula diluida muy lentamente, dejándola deslizar por las paredes del tubo para que no atravesase el menisco que forma la interfase.
9. Se introducen los tubos en la centrifuga correctamente.
10. Se centrifuga a 495 g durante 30 min a 15 °C sin freno. (Figura 2)
11. Se sacan cuidadosamente los tubos de la centrífuga y se depositan sobre la gradilla que se encuentra en la cabina de flujo.
12. Se recoge, cuidadosamente y con pipeta Pasteur de cristal conectada a una perilla de aspiración, el anillo celular formado sobre la solución de Ficoll y se transfiere al tubo estéril de 15 ml.
13. Estos anillos llevan la fracción de células mononucleadas (CMN) y se rellena hasta 10 ml de volumen con DPBS. Tras eso, se centrifuga (con el freno puesto) a 493 g, durante 10 min.
14. Se retira el resto de sobrenadante y se resuspende el sedimento con otros 10 ml de DPBS , para centrifugar en las mismas condiciones.
15. Se vuelve a retirar el sobrenadante y se resuspende el pellet celular en 5 ml de medio de cultivo.
16. Se toma una muestra de 10 μ l que se diluye 1:10 con DPBS para realizar recuento celular con el contador hematológico.
17. Una vez realizado el recuento de las células mononucleadas, se procederá a su siembra según el protocolo habitual de “Cultivo primario de células mononucleadas de médula ósea”.

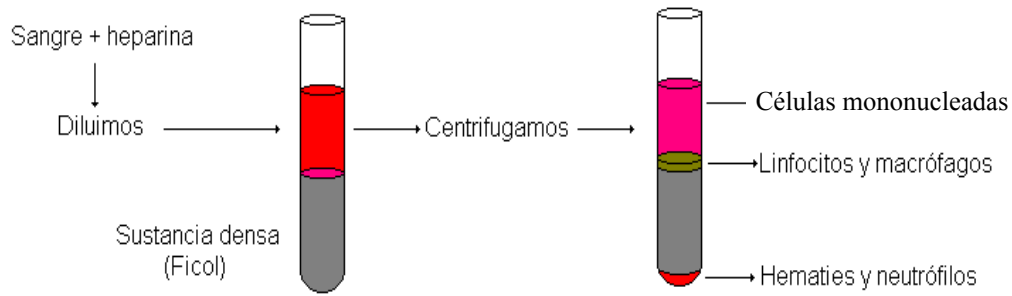


Figura 2. Esquema de obtención de la fracción mononucleada de médula ósea con gradiente de Ficoll.

2.1 Cultivo primario.

Una vez se conoce el recuento celular, se calcula la superficie necesaria para sembrar las CMN de MO a razón de 160.000 células/cm². Para ello se divide el número de células mononucleadas totales entre 160.000 y el resultado obtenido serán los cm² necesarios para la siembra.

El procedimiento es el siguiente:

1. Se añade al frasco de cultivo el volumen de CMN y la cantidad de medio de cultivo completo (DMEM + heparina (2U/ml) + 5% de lisado plaquetario + 50 µg/ml de gentamicina) necesaria para llegar a 25 ml.
2. Se introducen los frascos de cultivo cuidadosamente en el incubador, de manera que las etiquetas identificativas queden visibles desde el exterior y se incuba a 37°C y 5% CO₂.
3. El primer cambio de medio se realiza transcurridas 25-72 horas desde la siembra del cultivo primario y, posteriormente cada 3-4 días hasta que las células alcancen un 60-80% de confluencia, momento en el cual se realiza el 1º pase de cultivo. Así, sucesivamente.

2.2 Primer pase.

1. Se sacan cuidadosamente los frascos del incubador y se observa al microscopio invertido con objetivo 10x haciendo un barrido general por toda la superficie para estimar la confluencia.
2. Se retira todo el medio de cultivo restante por decantación.
3. Se lava cada frasco con 10 ml de DPBS depositándolo con pipeta serológica suavemente y sobre la zona del recipiente en la que no haya células. Se retira el DPBS decantando.
4. Se añaden 10 ml de Triple Select a cada frasco y se introduce en una estufa a 37°C durante 7-10 minutos.
5. Transcurrido este tiempo, se vuelven a observar las células al microscopio. En caso de que no se hayan despegado, se golpeará suavemente el recipiente y se introducirá en la estufa otros 2-5 minutos más.
6. Se vuelve a observar al microscopio y si no se han despegado volver a golpear suavemente.
7. Se aspira el contenido de los frascos con pipeteador automático, distribuyéndolo en tubos Falcon de 50 ml.
8. Para asegurar que se recoge todo el contenido de los frascos se realiza un lavado de los frascos con otros 10 ml de DPBS.
9. Se centrifuga durante 5 minutos a 430g.
10. Se retira cuidadosamente el sobrenadante de los tubos.
11. Se resuspende los pellet con 10 ml de Medio de cultivo.
12. Se ponen 10 μ l de la suspensión celular en un eppendorf de 0.5 ml para recuento celular y valoración de la viabilidad. Para ello se añaden otros 10 μ l de azul tripán (dilución 1:1), homogeneizando bien y se carga

el porta del contador con 10 μ l de esta mezcla. Se realiza el recuento celular en el contador celular automático de Biorad.

13. Se calcula la superficie de cultivo (número y tipo de recipientes) necesaria a 1000 células/cm².

14. Se toma con pipeta el volumen de suspensión celular correspondiente para cada recipiente y se rellena hasta alcanzar el volumen óptimo con medio fresco.

15. Se introducen los frascos de cultivo o factorías cuidadosamente en el incubador, de manera que las etiquetas identificativas queden visibles desde el exterior y se vuelve a incubar a 37°C y 5 % CO₂.

2.3 Segundo Pase

Se lleva a cabo siguiendo el mismo procedimiento, realizándose cada 7-10 días, cuando se alcanza el 60-80 % de confluencia. A partir del segundo pase, se subcultiva a razón de 3000 células/cm².

Se lleva a cabo siguiendo el mismo procedimiento que en primer pase pero en este caso, antes de retirar el medio se toma:

- Imágenes con la cámara fotográfica adaptada al microscopio para tener constancia de la morfología celular.
- 3-5 ml de medio de cada frasco/factoría de cultivo y unificarlos en un recipiente estéril. De este pool de medio de cultivo aspirar 0,4 ml con jeringa estéril, e inocular 0,2 ml en cada frasco del sistema Bact-Alert.

Tras el recuento se toman:

- 200.000 células en un criotubo para inmunofenotipo por citometría de flujo (que permite la medida simultánea de emisiones de fluorescencia y

dispersión de luz inducidas por la iluminación adecuada de células o partículas microscópicas en suspensión a medida que éstas fluyen de una en una a través de un compartimento de detección).

- 200.000 células sembradas en un T75 destinadas a estudio del cariotipo

La razón de siembra a partir del segundo pase será de 3000 células por cm².

Los controles de calidad llevados a cabo durante el proceso de cultivo y expansión de células mesenquimales quedan reflejados en la Tabla 2.

Tabla 2. Controles de calidad (CC) durante el proceso de cultivo y expansión de Células Stem Mesenquimales.

Test	Método utilizado	Criterio de aceptación
Confluencia (en todos los pases)	Microscopía	≥ 70%
Micoplasma (en pase 2)	PCR	Negativo
Control microbiológico (en todos los pases)	Bact Alert	Negativo
Recuento celular (en todos los pases)	Tinción con Trypan Blue por método automatizado	Base datos
Viabilidad (en todos los pases)	Tinción con Trypan Blue por método automatizado	> 60%
Fenotipo (en pase 2)	Citometría de flujo	≥ 95%
Cariotipo (en pase 2)	Citogenética convencional	Cariotipo normal
Morfología (en pase 2)	Microscopía (registro fotográfico)	Fibroblástica

2.4 Siembra de Células Madre Mesenquimales (MSC) sobre fosfato tricálcico (FTC).

Este protocolo se desarrolla en 2 etapas (1ª preincubación de los gránulos de FTC con lisado plaquetario heparinizado y 2ª siembra de las MSC sobre los gránulos preincubados) y se realiza en 2 días consecutivos. El FTC empleado es el Cellplex ® TCP (Wright Medical Emea. The Netherlands).

1º ETAPA: PREINCUBACIÓN DE LOS GRÁNULOS DE FTC CON LISADO PLAQUETARIO (LP).

1. Se coloca un tubo Falcon de 50 ml en la gradilla y se le quita el tapón.
2. Se acopla un filtro estéril de 100 micras a la boca del Falcon de 50 ml y se vierte a través de éste 30 ml de LP.
3. Posteriormente, se añade 200 µl de heparina al 5%, se tapa el Falcon y se homogeneiza bien la mezcla agitando suavemente.
4. Se abre una placa Petri y se abre el frasco de FTC.
5. Se carga una jeringa con los gránulos de FTC y se deposita sobre la tapa de la placa de Petri. (Figura 3)
6. Se vierte el LP heparinizado en la placa de Petri y se aspira con la jeringa que contiene los gránulos de FTC (para que penetre bien por los poros del material se taponan la jeringa colocando el dedo en la punta de jeringa y tirar del émbolo hacia atrás varias veces).

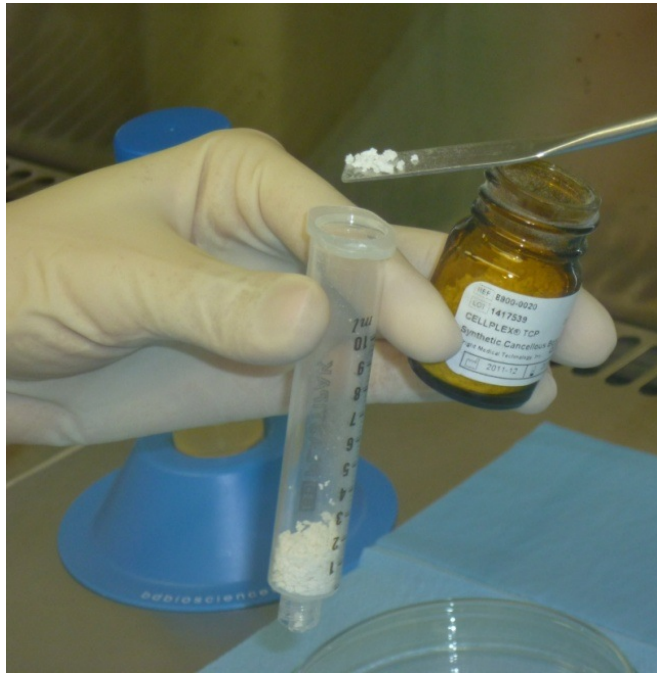


Figura 3. Colocación del fosfato tricálcico en la jeringa previa a su mezcla con lisado plaquetario.

7. Se abre la otra placa de Petri, y tras retirar el émbolo de la jeringa se vierte el contenido de la misma sobre la placa.

8. Se carga con una espátula uno de los pocillos de la placa de cultivo, de forma que el fondo quede tapizado, procurando quede el máximo contacto entre los gránulos. Seguidamente se homogeneizan suavemente dichos gránulos con el émbolo de la jeringa (para disminuir su tamaño y aumentar el contacto entre ellos).

9. Se cubre el pocillo con 2 ml de lisado plaquetario.

10. Se introduce finalmente la placa en el incubador durante 12-24 horas.

2º ETAPA SIEMBRA DE LAS MSC SOBRE LOS GRÁNULOS PREINCUBADOS CON LP .

-Despegar las células según protocolo de pase (SEGUNDO PASE) dejándolas reservadas en un lado de la cabina.

-Sacar la placa con el FTC del incubador y retirar el exceso de lisado plaquetario con una pipeta pasteur estéril.

-Tomar el volumen necesario de suspensión celular para tener 180.000 células. Llevar este volumen hasta 6 ml con medio .

-Esta suspensión celular se repartirá en tres de los pocillos previamente incubado con el lisado plaquetario, repartiéndola por toda la superficie del pocillo. El otro pocillo será de control (fosfato tricálcico con medio de cultivo).

-Transcurridos 6 días de la siembra retirar cuidadosamente el medio de cultivo y añadir 2 ml de medio completo a cada pocillo aplicándolo sobre las paredes de la placa. Posteriormente, se realizarán cambios de medio cada 3-4 días con el Medio (Figura 4).



Figura 4. Relleno de pocillos con FTC.

Los procedimientos de control que permiten garantizar que la siembra de Células Stem Mesenquimales sobre fosfato tricálcico FTC se realiza de forma adecuada están reflejados en la Tabla 3.

Tabla 3. Controles internos en proceso de siembra de MSC sobre fosfato tricálcico

Test realizado (IPC)	Criterio de aceptación
Confluencia	Microscopía
Temperatura	37°C ± 5°C
CO2	5% ± 0,5%

2.5 Acondicionamiento.

A las dos semanas de cultivo aproximadamente, se procedió al envasado del medicamento siguiendo el siguiente protocolo:

- Colocar una duquesita abierta para ser usada como recipiente de residuos.
- Verter el contenido de una ampolla de 10 ml de suero salino en un tubo Falcon de 15 ml estéril. Colocarle el tapón.
- Sacar las placas de fosfato tricálcico con las células mesenquimales del incubador.
- Retirar cuidadosamente el medio sin tocar los gránulos con pipeta Pasteur.
- Lavar el pocillo 2 veces con 2 ml de suero salino fisiológico de grado clínico con mucho cuidado.
- Tras retirar el sobrenadante del último lavado, añadir el volumen de suero salino fisiológico suficiente (1-2 ml) para que el material quede humedecido (para evitar desecación antes de ser implantado en el animal)..

3. Controles para evaluar la calidad de las células

Con el fin de garantizar la calidad de las Células Madre Mesenquimales obtenidas y cumplir los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) se realizaron los siguientes procedimientos (Tabla 4):

3.1 Microbiología.

Se toman muestras para cultivo de aerobios y anaerobios para control microbiológico mediante el sistema Bact-Alert.

3.2 Morfología.

Mediante la observación a microscopía óptica se comprueba que las MSC sean adherentes y tengan morfología fibroblastoide.

Morfológicamente, las células troncales mesenquimales se caracterizan por presentar una morfología alargada, en forma de huso, con la presencia de un núcleo oblongo, central, que contiene de dos a tres nucléolos. Se realiza un registro escrito y fotográfico del aspecto de las células los días de cambio de medio hasta el pase 1 y posteriormente antes de cada pase hasta el último, previo a la siembra sobre el biomaterial.

Las MSC mostraron la morfología típica en huso con núcleo central alargado con 2-3 nucléolos. Esta morfología fue constante en el 100% de las muestras, observándose en todos los casos células con un característico aspecto fibroblástico con largas prolongaciones (Figura 5).

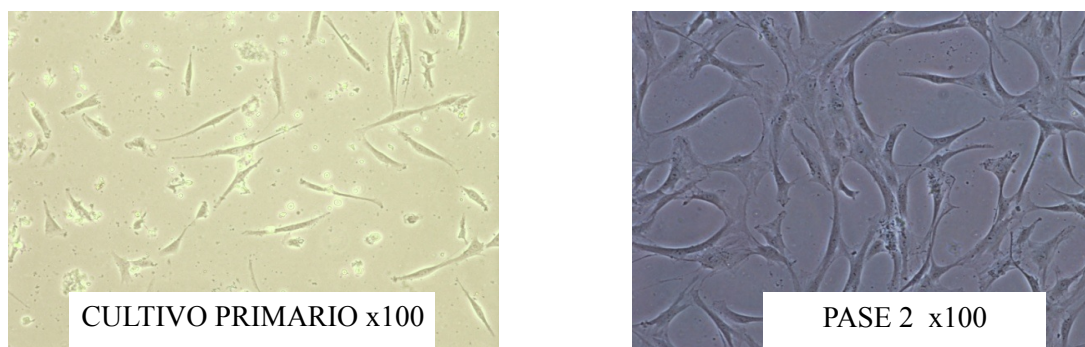


Figura 5. Imagen microscopio óptico de células en cultivo primario y tras pase 2.

3.3 Viabilidad.

La viabilidad se analizó mediante tinción con colorante vital Trypan Blue (Sigma Aldrich, Estados Unidos) y recuento celular con el contador automático celular de Biorad. La viabilidad evaluada con Trypan blue fue mayor del 75% en todas las muestras.

3.4 Cariotipo.

La estabilidad cromosómica de las células mesenquimales cultivadas fue estudiada mediante cariotipo convencional para comprobar la ausencia de alteraciones numéricas y estructurales. Para ello se envió un frasco de cultivo tipo T175 (Sarstedt®, Alemania) en pase 2 al 60% de confluencia de cada una de las muestras a la Unidad de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca. Se estudiaron 30 metafases y se cariotiparon 4, mediante tinción de bandas G. Mediante cariotipo convencional se comprobó la ausencia de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales.

3.5 Proliferación.

Se calculó el número de divisiones de cada muestra desde pase uno hasta que las células fueron despegadas para comprobar que éstas no excedieran de 20 duplicaciones.

Tabla 4. Controles para evaluar la calidad de las células

MUESTRA	M1	M2	M3	M4
MORFOLOGÍA	fibroblástica	fibroblástica	fibroblástica	fibroblástica
VIABILIDAD (%)	97	87	96	98
MICROBIOLOGIA	negativa	negativa	negativa	negativa
CARIOTIPO	normal	normal	normal	normal
Nº DIVISIONES	8.4	9.32	5.2	5.48

3.6 Inmunofenotipo.

Las células mesenquimales se caracterizaron fenotípicamente por citometría de flujo multiparamétrica (FACS modelo Beckman Coulter Navius, Becton-Dickinson [BD], San Jose, CA). Se estudió la expresión de los antígenos de membrana exigidos según ISCT para la identidad mesenquimal: (Tabla 8)

- Positivo ($\geq 95\%$): CD90, CD73, CD105
- Negativo ($\leq 2\%$): CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19, HLA-DR

Tabla 5. Porcentaje de células que expresaron estos marcadores en cada una de las muestras.

MUESTRA	M18	M21	M22	M23	M24
% CD90	98	99	100	99	99
% CD105	99	98	97	96	95
% CD73	99	99	99	98	98
%CD45,34,20,14	1	1	1	1	1

3.7 Diferenciación.

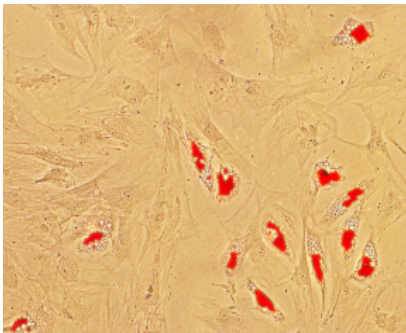
Para comprobar la capacidad de diferenciación osteogénica, se cultivaron las células mesenquimales en un medio específico que induce la diferenciación osteogénica (NH Osteodiff Médium, Miltenyi®, Bistec, Alemania). Estos cultivos se mantuvieron durante 4 semanas. El recambio de medio se realizó cada 3-4 días. Transcurrido este tiempo, se comprobó la coloración de la actividad de fosfatasa alcalina (púrpura) con el sustrato NBT (SIGMA FAST BCIP/NBT, Sigma Aldrich®, Estados Unidos).

La diferenciación adipogénica se evaluó tras 3 semanas en cultivo (Figura 6). Cuando las células alcanzaban el 70-80% de confluencia, se les sustituía el medio por el medio de diferenciación NH Adipodiff Médium® (Miltenyi Biotec®, Alemania). Para comprobar la existencia de acúmulos lipídicos citoplasmáticos se utilizó la tinción con Rojo al aceite-O (Oil-Red_O solution, Certistain® Merck KgaA, Darmstadt, Alemania). La diferenciación adipogénica se evidenciaba por la presencia de vacuolas citoplasmáticas cargadas de grasas neutras coloreadas de rojo-naranja.

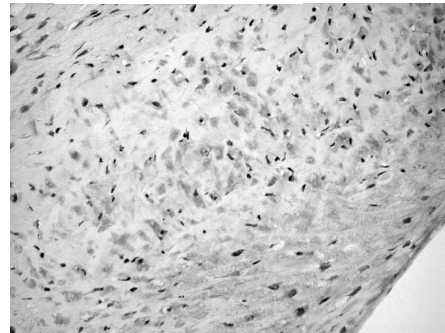
La diferenciación condrogénica se evaluó tras 4 semanas en cultivo. Se realizó en cultivos de micro-masa utilizando el medio de inducción NH ChondroDiff® (Miltenyi Biotec MACS® Media, Bergisch Gladbach, Alemania), estandarizado para la diferenciación condrogénica in vitro de las CSM de médula ósea. A los 24 días se procedió a la preparación de la muestra para evaluar la diferenciación condrogénica a través de la detección de colágeno II por coloración de los proteoglicanos por citoquímica con una solución de azul alcian al 1% en ácido acético glacial al 3 %.

El 100% de los cultivos de las Células Madre Mesenquimales de médula ósea obtenidas de los donantes mostró una correcta diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.

OSTEOCITOS



CONDROCITOS



ADIPOCITOS

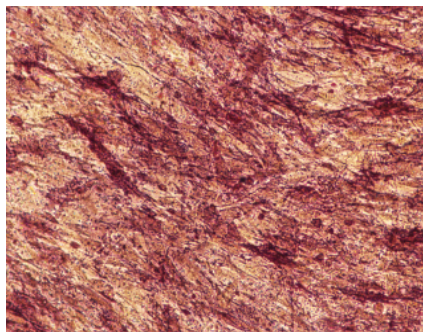


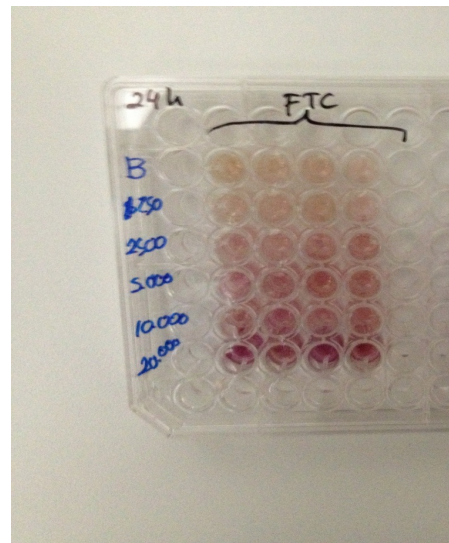
Figura 6. Imagen microscopio óptico de células mesenquimales diferenciadas. x100

3.8 Estudio de cinética / proliferación (MTT) del cultivo de Células Madre Mesenquimales sobre fosfato tricálcico.

Para evaluar la proliferación in vitro de las células mesenquimales sobre una matriz desmineralizada de fosfato tricálcico y poder establecer el tiempo óptimo de cultivo antes de implantar el constructo, se llevó a cabo un experimento usando el bioensayo de las sales de Tetrazolio (MTT). Las sales de tetrazolio (MTT) son especialmente útiles para ensayos de cuantificación de células viables porque la conversión de las sales de tetrazolio (amarillo y soluble) a cristales de formazan (púrpura e insoluble) sólo se puede producir por la actuación de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas.

El objetivo de este procedimiento es valorar la adhesión-viabilidad de las células mesenquimales cultivadas sobre una capa de fosfato tricálcico. Sembrando además concentraciones crecientes de las mismas para poder estimar los rangos que permitan elaborar la curva patrón de crecimiento.

Los resultados obtenidos, se muestran a continuación (Figura 7).



TIEMPO

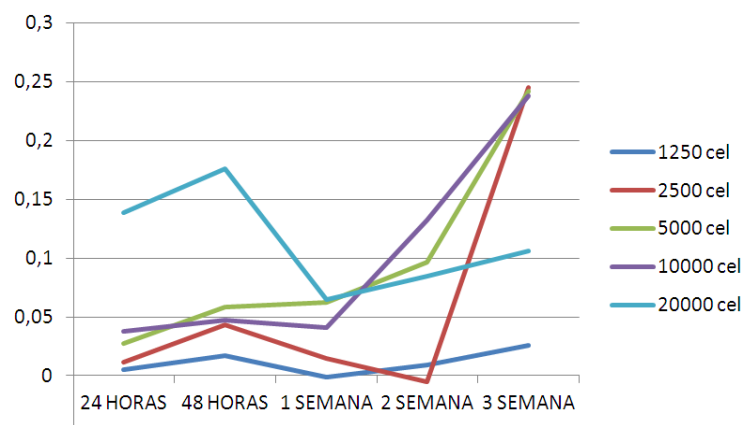


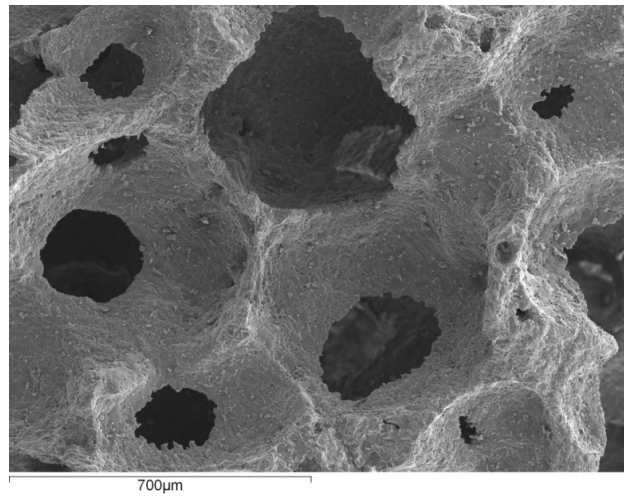
Figura 7. Imagen cambio de color y curva patrón de crecimiento.

3.9 Estudio de microanálisis de biomaterial.

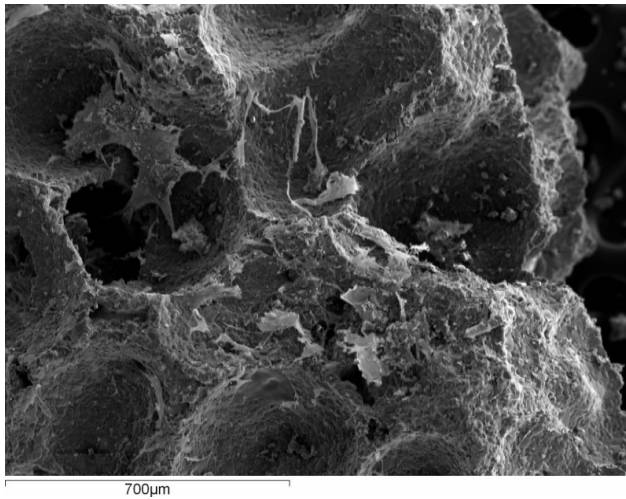
Se llevó a cabo un estudio estructural de las células crecidas sobre la matriz de fosfato tricálcico para evaluar la adhesión de las mismas y la ultraestructura de la cerámica. Para ello, se fijaron muestras de células mesenquimales humanas tras 2 semanas de cultivo sobre el fosfato tricálcico respetando la concentración y tiempo óptimos obtenidos en el ensayo del apartado anterior.

Una vez fijadas, se procesaron para ser observadas con el Microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanner de microscopía electrónica) comprobándose la adhesión de las células al biomaterial (Figura 8).

ULTRAESTRUCTURA FOSFATO TRICÁLCICO



FOSFATO TRICÁLCICO + MSC



FOSFATO TRICÁLCICO + MSC

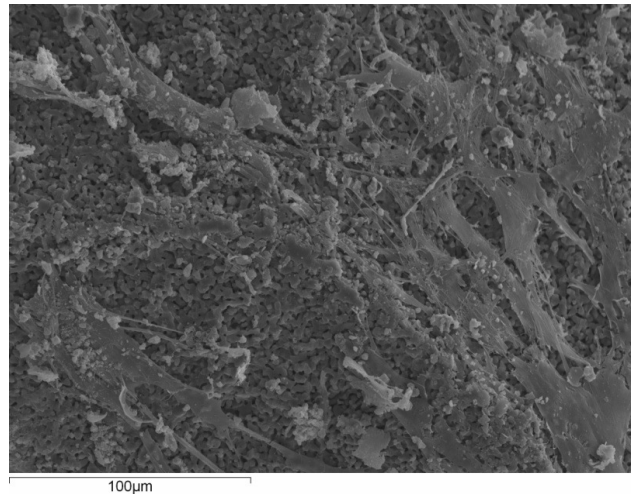


Figura 8. Ultraestructura en Scanner de microscopía electrónica.

4. Desarrollo del constructo.

Para la implantación de las células mesenquimales desarrollamos un constructo final que se obtuvo el día de la cirugía utilizando la cabina de flujo laminar. Partiendo del cultivo de células mesenquimales (MSC) sobre el fosfato tricálcico (FTC), se mezcla con Matriz ósea desmineralizada (MSC +FTC+MOD). La MOD empleada es Grafton ® Orthoblend (Medtronic Iberica. Madrid).

Este constructo será implantado en los animales del grupo experimental con el objeto de evaluar el perfil de seguridad del medicamento (toxicidades aguda y crónica, tumorigenicidad) y para determinar su eficacia en la formación de tejido óseo humano en dicha localización (Figura 9).

El modelo de constructo empleado para los animales del grupo control partía del FTC mezclado con suero salino fisiológico al 0,9% pero sin incluir células mesenquimales; que fue mezclado con Matriz ósea desmineralizada (SSF 0,9%+FTC+MOD) en la cabina de flujo laminar también el mismo día de la cirugía.

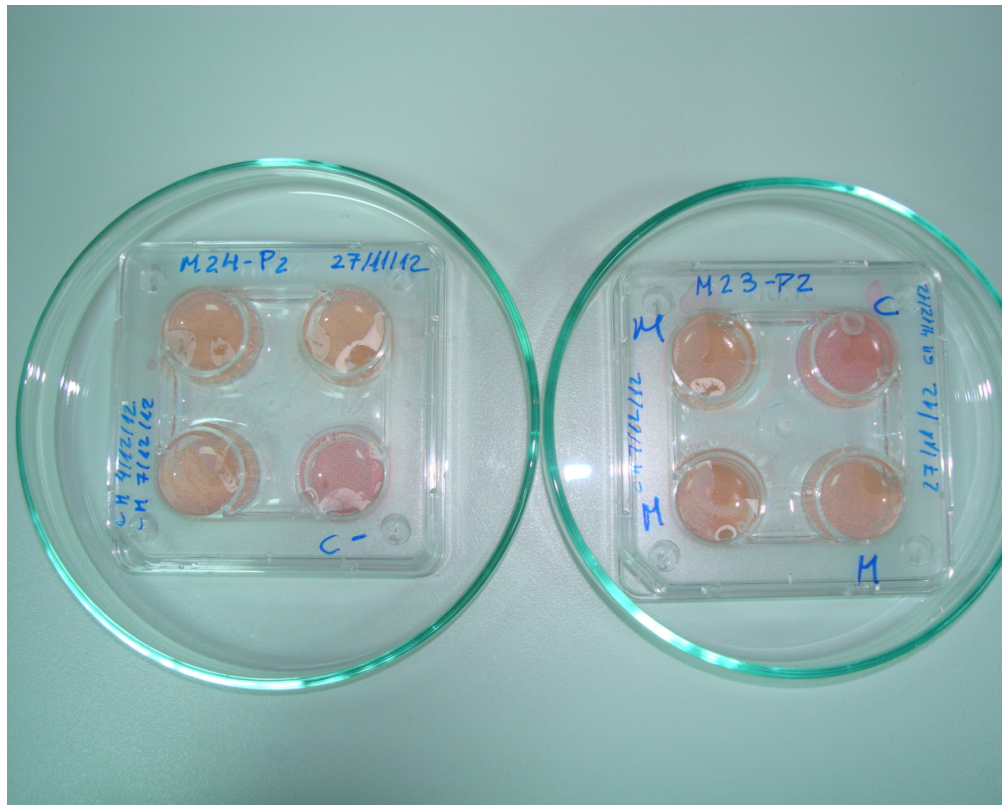


Figura 9. Pocillos con cultivo de MSC en FTC (M) y pocillo con cultivo de SSF 0,9% + FTC (C).

5. Modelo animal

En este estudio se ha realizado sobre un total de 30 ratones NOD/SCID (*non-obese diabetic and severe combined immunodeficiency*) con un peso medio de 20g. El proyecto ha sido aprobado por el CEEA (Comité de Ética de Experimentación Animal) del HCUVA. (Anexo 3).

Los ratones 15 machos y 15 hembras NOD/ SCID (Harlan laboratories ® Inc. USA) de 6 semanas de vida procedentes de Italia. Tanto la recepción, como el aclimatamiento, cirugía y posterior observación se ha realizado en el animalario de la Universidad de Murcia (UM), Edificio “Centro de Investigación Biomédica” (CEIB) localizado en la Calle Campo s/n del Palmar 30120 Murcia.

Previo a la realización del estudio los animales siguieron un proceso de aclimatación durante 2 semanas. Para ello fueron trasladados 6 jaulas, disponiendo 5 animales en cada una, utilizando una campana de flujo y guantes estériles.

Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes a lo largo de todo el estudio, consistiendo en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad a temperatura ambiente constante de 20° y humedad de 48%.

Las jaulas disponían de acceso ad libitum de agua radiada y alimentación; esta consistió en comida comercial estándar esterilizada para ratas y ratones de experimentación que contenía 22% de proteínas, 5% de grasa, 5% de fibra, 3,5 Kcal/g.

Los animales fueron tratados siguiendo las normas de la Directiva Europea 86/609 y el Real Decreto 223/1988 del 14 de Marzo, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos B.O.E. N° 68 de 18 de Marzo de 1988.

Los 30 ratones fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos: uno de 25 ratones (Grupo I caso) y otro de 5 ratones (Grupo II control).

En el Grupo I (25 ratones NOD/SCID) se implantó en cada animal, tanto de forma subcutánea como de forma intramuscular, el modelo de constructo formado por una matriz de fosfato tricálcico (FTC) sobre la que se cultivaron células mesenquimales humanas (MSC) y posteriormente mezclado con matriz ósea desmineralizada.

Las MSC humanas han sido obtenidas tal y como se ha descrito previamente.

En el Grupo II, control, (5 ratones NOD/SCID) la cirugía consistió en implantar, siguiendo el mismo procedimiento subcutánea e intramuscularmente, el modelo de constructo que denominaremos tipo 2 formado por fosfato tricálcico + matriz ósea desmineralizada + suero salino fisiológico (FTC+SSF 0,9%+MOD). (Figura 10).

Los 2 grupos de animales fueron sacrificados introduciéndolos en una campana rica en dióxido de carbono (CO₂) durante 2-3 minutos. En el Grupo I se sacrificaron 2 animales a las 24 h, 2 a las 48 h, 2 tras una semana, 2 a las 2 semanas, 2 a las 5 semanas, 2 a las 7 semanas, 2 a las 9 semanas y 11 ratones a las 12 semanas. El Grupo II se sacrificaron los 5 animales a las 12 semanas.

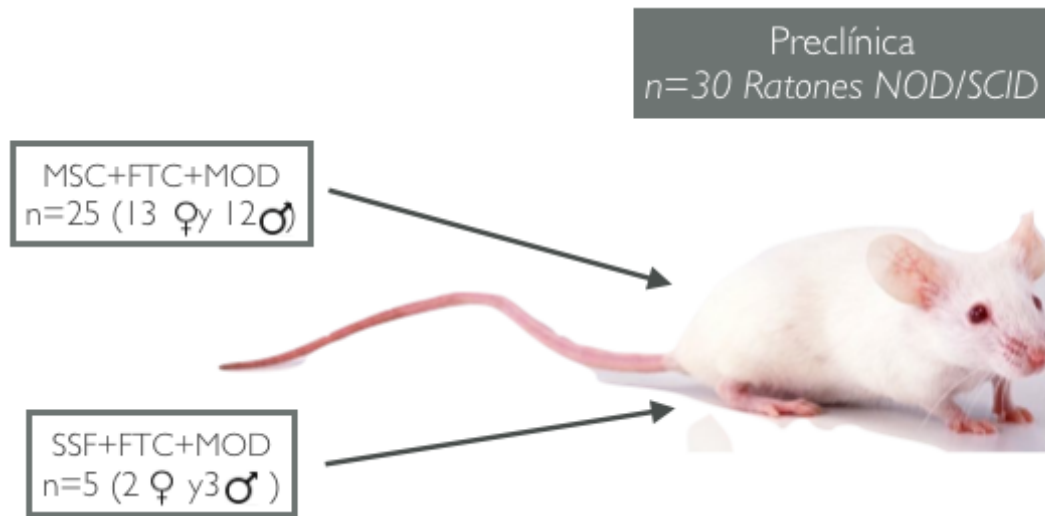


Figura 10. Estudio de implante de constructo formado por (MSC+FTC+MOD) y (FTC +SSF 0,9%+MOD) MSC(Células Madre Mesenquimales); FTC (Fosfato Tricálcico); SSF (Suero salino fisiológico).

5.1 Características del modelo murino NOD/SCID.

El modelo de ratón NOD/SCID es un ratón diabético no obeso con inmunodepresión del tipo inmunodeficiencia severa combinada. Son ratones albinos a los que se les ha transferido el gen mutado $\text{Prkdc}^{\text{scid}}$ (NOD.CB17- $\text{Prkdc}^{\text{scid}}$ /NCrHsd) en el cromosoma 16 produciendo la inmunodeficiencia combinada severa.

Entre las características fisiológicas de los ratones se encuentran una temperatura de 37.5°C , un pulso de 600 pulsaciones/min y un ritmo respiratorio de 163/min (170).

Estos ratones presentan nódulos linfáticos ausentes y alteraciones en la pulpa blanca en el bazo aunque con el tiempo y a pesar de encontrarse en medios libres de patógenos pueden desarrollar la adquisición espontánea de inmunidad.

Es considerado el modelo animal adecuado para la investigación del comportamiento de las células madre humanas.

El ratón sigue siendo el animal más difícil para el logro de una verdadera anestesia quirúrgica sin que se produzca la muerte. Aparte de las sobredosis de anestesia, quizás las causas más comunes de mortalidad anestésica sean una excesiva pérdida de calor y la hipotermia (relacionada con la alta proporción de superficie:masa) y las rápidas alteraciones de intercambios de gases (relacionadas con las altas velocidades metabólicas y respiratorias).

Adicionalmente, al ser tan estrecha la vía de ventilación, ésta se obstruye fácilmente con las secreciones o acumulaciones de saliva de la faringe. Dado que en nuestro estudio la cirugía llevó unos 5 minutos de media cada una, requirió un tiempo anestésico corto lo que permitió un óptimo control de la misma. La anestesia se ha realizado mediante inhalación continua de sevoflurano USP® (Baxter Healthcare Corporation, IL, USA) y oxígeno. Como inductor anestésico se ha empleado el isoflurano empapado en una gasa estéril.

5.2 Condiciones de mantenimiento y seguimiento de los animales.

Las instalaciones destinadas al mantenimiento y manejo de los animales están construidas con paredes y suelos recubiertos por material de fácil lavado, resistente a la aplicación de desinfectantes; techos lisos, uniformes, fáciles de limpiar y con bordes sanitarios; cierres herméticos en las puertas y con factores controlados, entre ellos, los ambientales (temperatura, humedad, ventilación, presurización) y físico-químicos (iluminación, ruido, sanitizantes, etc.).

La instalación cuenta con dos pasillos independientes de acceso; quedando separados el acceso y salida de la sala.

Los ambientes destinados al mantenimiento de los animales poseen ventilación con presión positiva de aire respecto a los pasillos o áreas exteriores, manteniendo las gradientes de presión, de tal forma que se evita el ingreso de patógenos desde el exterior.

Las instalaciones físicas incluyen racks ventilados con presión positiva, cabinas de seguridad biológica, esclusas, vestidores, con presión diferencial de aire, renovación de aire/hora, filtración y tratamiento de agua.

El equipamiento incluyó implementos de protección personal, como vestimenta, mascarilla, gorro y guantes estériles.

Se emplearon protocolos normalizados de trabajo con respecto al ingreso de personal, de materiales, de limpieza y desinfección de ambientes y de materiales.

Todas las tareas relacionadas con el cambio de cubetas, esterilización de cubetas y biberones, manejos de los animales y control sanitario fueron realizadas por los investigadores y el personal del animalario en la campana de flujo laminar (Figura 11).



Figura 11. Campana/Cabina de flujo laminar

Los animales del estudio estuvieron alojados en condiciones SPF (Libres de patógenos específicos) en sistemas de racks ventilados con presión positiva. (Figura 12) Los cambios de cubetas se realizaron en la cabina de flujo y seguridad biológica evitando riesgos de contaminación. Las cubetas fueron desinfectadas y autoclavadas. Se llevó un registro de todas las entradas/salidas de animales y cambio de animales.



Figura 12. Racks ventilados.

Todo el personal implicado en este proyecto recibió la formación adecuada y obligatoria según Real Decreto 1201/2005 (Categorías B, en el caso de los técnicos y C, en el caso de los investigadores).

5.3 Seguridad del procedimiento.

El procedimiento realizado ha garantizado la completa seguridad del animal. Tanto la matriz ósea desmineralizada como la matriz de fosfato tricálcico empleada son materiales de grado clínico por tanto autorizados para su uso rutinario en humanos y previamente testados en animales de experimentación.

Los componentes que se han utilizado corresponden a los elementos biológicos necesarios para la formación y regeneración del tejido óseo, tales como:

1.- Células osteoprogenitoras (Células Madre Mesenquimales) aisladas de la médula ósea humana.

2.- Material osteoinductor de la diferenciación celular hacia células de estirpe osteoblástica presente en la matriz ósea desmineralizada.

3.- Elementos osteoconductores o matrices (biomateriales) que proporcionan el medio de transporte de estas células osteoprogenitoras al mismo tiempo que actúan como andamiaje dirigiendo el crecimiento del tejido óseo neoformado.

De modo natural, estos tres componentes están ya presentes en el tejido óseo esponjoso, por lo que no supone morbilidad añadida. La asociación de los tres componentes mencionados, se ha realizado inmediatamente previa a un único acto quirúrgico en el que han sido aplicados mediante una técnica mínimamente invasiva tal y como se describe más adelante.

5.4 Cronograma de tareas

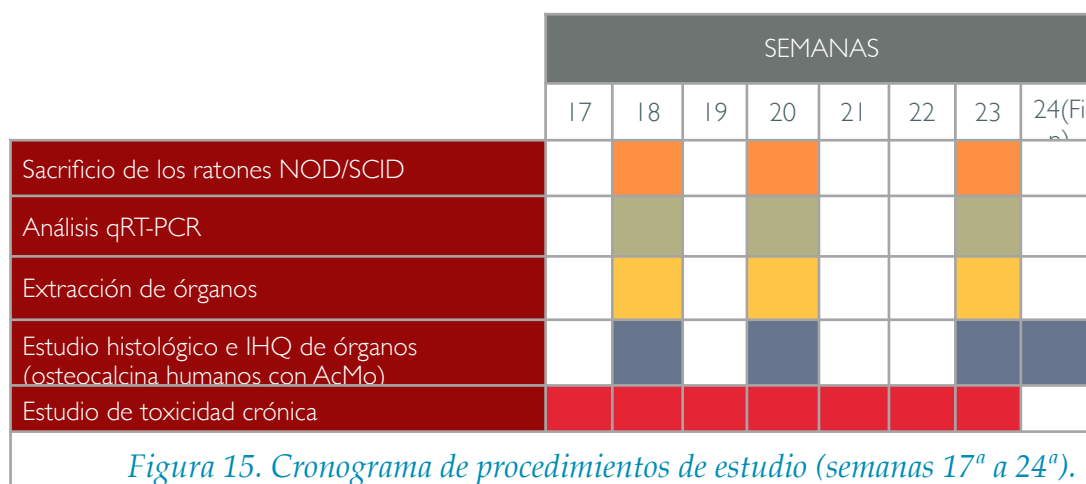
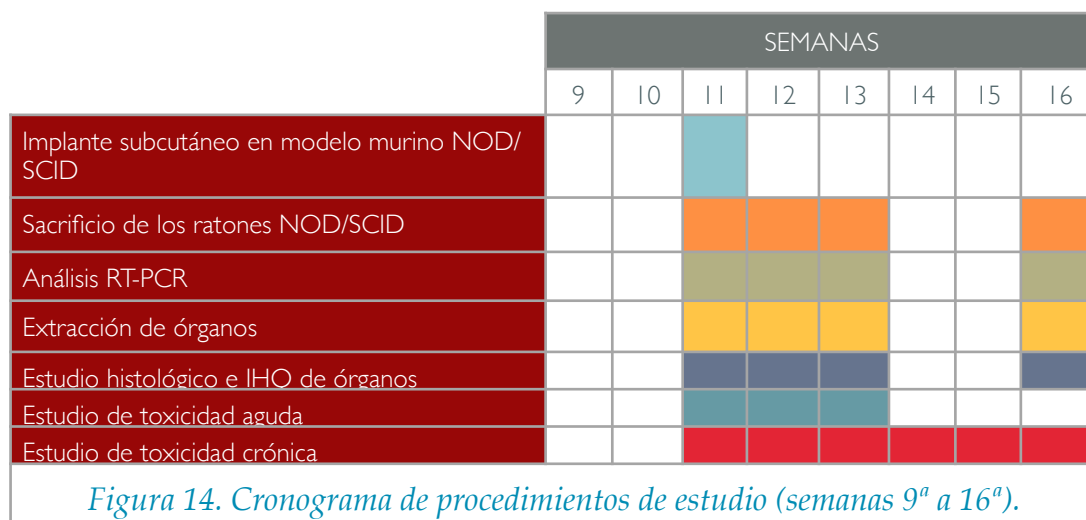
Se elaboró un cronograma de las tareas a desempeñar con plazo establecido por semanas para optimizar las acciones (figuras 13, 14 y 15).

Las fechas en que se realizaron los sacrificios fueron establecidas para realizar una correcta evaluación de toxicidades aguda y crónica del constructo, en especial de las MSC, su biodistribución y la hipotética diferenciación osteoblástica tras la cirugía.

Una pareja de ratones (1 macho y 1 hembra) cuyo implante subcutáneo estaba formado por el constructo MSC+FTC+MOD fueron sacrificados de acuerdo con la siguiente tabla de tiempos postcirugía: 1 día, 2 días, 1 semana, 2 semanas, 5 semanas, 7 semanas, 9 semanas.

	SEMANAS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Obtención MSC humana de donantes								
Cultivo MSC humana de donantes								
Sembrado en Fosfato tricálcico								
Estudio de citometría de flujo (MO inicial y tras cultivo)								
Cultivos de diferenciación								

Figura 13. Cronograma de procedimientos de estudio (semanas 1^a a 8^a).



MATERIAL Y MÉTODO

Los 5 ratones cuyo implante subcutáneo estaba formado por el constructo SSF 0,9%+FTC+MOD, y los restantes 11 ratones cuyo implante subcutáneo estaba formado por el constructo MSC+FTC+MOD se sacrificaron en la 12ª semana, fecha final del estudio (Tabla 6).

Tabla 6 . Cronograma de sacrificios del estudio en semanas 0 a 12ª.

	0 horas	24 horas	48 horas	1 semana	2 semanas	5 semanas	7 semanas	9 semanas	12 semanas
CASO 1		SACRIFICIO							
CASO 2		SACRIFICIO							
CASO 3			SACRIFICIO						
CASO 4			SACRIFICIO						
CASO 5				SACRIFICIO					
CASO 6				SACRIFICIO					
CASO 7					SACRIFICIO				
CASO 8					SACRIFICIO				
CASO 9						SACRIFICIO			
CASO 10						SACRIFICIO			
CASO 11							SACRIFICIO		
CASO 12							SACRIFICIO		
CASO 13								SACRIFICIO	
CASO 14								SACRIFICIO	
CASO 15									SACRIFICIO
CASO 16									SACRIFICIO
CASO 17									SACRIFICIO
CASO 18									SACRIFICIO
CASO 19									SACRIFICIO
CASO 20									SACRIFICIO
CASO 21									SACRIFICIO
CASO 22									SACRIFICIO
CASO 23									SACRIFICIO
CASO 24									SACRIFICIO
CASO 25									SACRIFICIO
CONTROL 1									SACRIFICIO
CONTROL 2									SACRIFICIO
CONTROL 3									SACRIFICIO
CONTROL 4									SACRIFICIO
CONTROL 5									SACRIFICIO

6. Implante del constructo al ratón.

6.1 Protocolo de anestesia y técnica quirúrgica.

Tanto el pesaje, como el protocolo de anestesia, la cirugía y manipulación de los animales se ha realizado en campana o cabina de flujo laminar y seguridad biológica. El cirujano y el ayudante con bata y guantes estériles han colocado todo el instrumental debidamente esterilizado en la campana de flujo.

Antes de iniciar el procedimiento quirúrgico se entra en la Sala, se quita la tapadera protectora de la campana de flujo, se limpia con alcohol de 70° y se enciende al menos 20 minutos antes de iniciar la cirugía. Entre procedimiento y procedimiento se debe limpiar el área de trabajo con alcohol de 70°.

Posteriormente se conecta el respirador relleno con una mezcla de Sevoflurano USP ® (Baxter Healthcare Corporation, IL, USA) y el oxígeno. Se limpia igualmente el tubo de inhalación con alcohol 70° antes de cada sesión y entre los distintos procedimientos. (Figura 16)

Tras eso, y con guantes y manguitos estériles, se procede a preparar una placa petri con alcohol 70° para realizar la limpieza entre los distintas intervenciones, y también otro recipiente con líquido Instrunet® (Inibsa laboratoris Barcelona) para esterilizar el material quirúrgico.

Se coloca un paño verde estéril y sobre él, el material de campo: guantes estériles (Protegrity®), gasas, paño de campo desechable, esparadrapo, Betadine®, sutura (monocryl 6/0 reabsorbible de Ethicon®), separadores ortostáticos, pinzas de microcirugía, pinzas Adson, porta, tijeras de microcirugía, hoja de bisturí n° 15. Además se prepara una placa de petri con 3 pocillos que contienen el constructo fosfato tricálcico + células mesenquimales + matriz ósea desmineralizada (FTC+MSC+MOD) y el 4° pocillo que contiene el constructo formado por fosfato tricálcico + suero salino fisiológico + matriz ósea desmineralizada (FTC+SSF 0,9%+MOD).



Figura 16.. Carrito con respirador y toma de oxígeno empleado durante la anestesia.

Una vez todo ha sido debidamente colocado y ya en condiciones de asepsia se pesa el animal. Posteriormente se procede a la inducción anestésica con gasa empapada en 2 gotas de isofluorano. El ratón es colocado en decúbito prono fijando con esparadrapo las extremidades extendidas de forma anatómica e introduciendo el hocico en el tubo de inhalación de anestésico, regulado a un flujo de 2l/min. (Figura 17)



Figura 17. Material preparado dentro de la campana de flujo laminar.

El grado de profundidad anestésica se controla vigilando la respiración del animal, la cual debía encontrarse en las 80-100 respiraciones por minuto y valorando el reflejo de podal.

El reflejo podal que buscamos es la ausencia de retracción de la pata trasera en respuesta al punzamiento de la almohadilla dactilar del pie.

Tras la cirugía el ratón es devuelto a una jaula individual con agua radiada y comida esterilizada (descrita previamente) ad libitum y protegido con una gasa estéril.

La descripción detallada de la técnica quirúrgica empleada para el implante del constructo FTC+MSC+MOD es la siguiente:

Con el ratón adecuadamente anestesiado y colocado en decúbito prono, dentro de la cabina de flujo, se realiza una incisión en la piel de 0,7 cm, con la hoja de bisturí del n° 15 desechable, paralela a la columna vertebral en su porción lumbar. Con una pinza se procederá a realizar dos espacios, uno en cada lado, dispuestos en un lado de forma subcutánea y en el otro de forma intramuscular

En el espacio subcutáneo se implantan aproximadamente 0,3 cc del constructo (o tipo 1 o tipo 2). De forma contralateral, en el espacio intramuscular se implanta aproximadamente 0,3 cc del constructo (o tipo 1 o tipo 2) y se le da un punto de Monocryl 6/0 (Ethicon®) para cerrar el músculo.

Finalmente se cierra la incisión en la piel con un punto con Monocryl 6/0, (Ethicon®). (Figura 18)

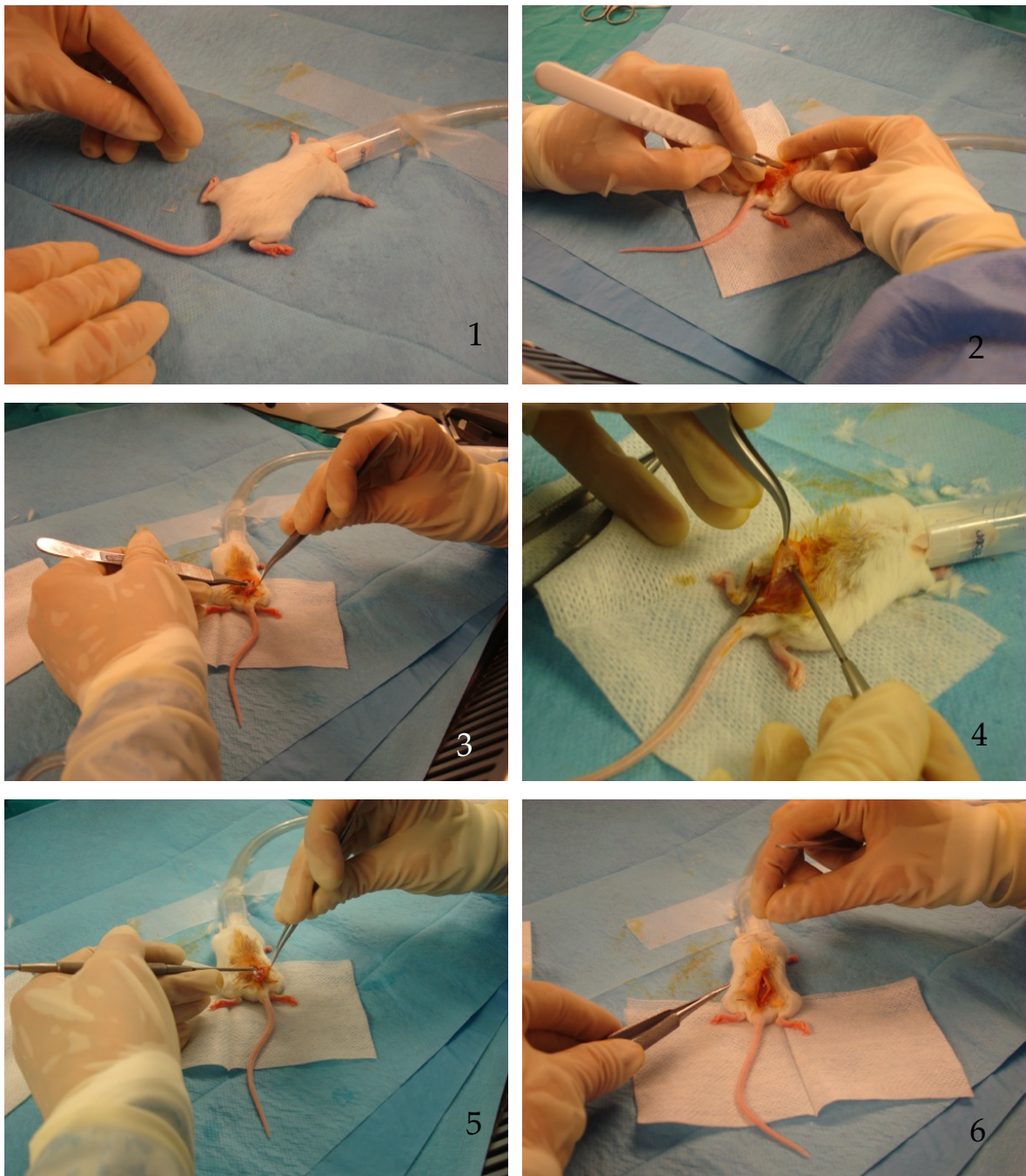


Figura 18. Secuencia de tratamiento quirúrgico. 1. Colocación del ratón. 2. Incisión. 3. Disección subcutánea. 4 Colocación de constructor SC. 5 Colocación de constructo IM. 6 Cierre.

6.2 Protocolo de necropsia.

El día del sacrificio se coge la Hoja de recogida de datos (Anexo 4) que incluye la ficha identificativa del ratón y se sigue el protocolo normalizado de trabajo del día del sacrificio (Anexo 5).

En primer lugar, se rellena la Petición de biobanco (Anexo 6) con los códigos descritos y colocan los cassettes para estudio histológico, etiquetados con el código del Biobanco asignado a cada animal, se rotula con rotulador permanente el código en los criomolde, donde se depositan los órganos para estudio de PCR-RT.

Estos códigos terminan con un guión y un número del 1 al 10 que hace referencia a cada uno de los órganos extraídos para estudio, y de esta forma el mismo órgano siempre tiene el mismo número. A continuación detallamos el orden de los órganos tomados:

Nº 1: Corazón.

Nº2: Pulmón.

Nº3: Hígado.

Nº4: Bazo.

Nº5: Riñón.

Nº6: Gónada.

Nº7: Cerebro.

Nº8: Médula ósea.

Nº9: Calota

Nº10: Sangre periférica.

Nº11: Constructo subcutáneo.

Nº12: Constructo intramuscular.

El sacrificio de los animales se realiza en campana rica en CO₂ durante 2-3 minutos.

Transcurrido ese tiempo y en condiciones de asepsia se procede a colocar el ratón en decúbito supino.

Se desinfecta con alcohol 70° y se realiza una incisión en línea media de 3 cm. Se diseca hasta descubrir el corazón. Con una jeringa de 1ml y aguja de insulina se realiza una punción intracardíaca obteniendo un mililitro de sangre para su análisis de PCR-RT o reacción en cadena de la polimerasa por retrotranscripción. Otro mililitro para la realización de hemograma y otro mililitro la realización del análisis bioquímico.

El tubo sanguíneo de hemograma y PCR-RT es portador de EDTA y además se conserva en frío.

Se procede a obtener 2 secciones del corazón, 2 del pulmón (una del derecho y una del izquierdo), 2 del bazo, 2 secciones del riñón (una del derecho y una del izquierdo). Se identifican las gónadas y se extraen también las 2 y lo mismo sucede con el cerebro.

Una de las secciones de cada órgano se coloca en un criomolde debidamente identificado y conservado en OCT y en hielo que es utilizada para realizar el análisis PCR-RT y la otra muestra se coloca en un cassette que tras ser cerrado se conserva en formol para su posterior análisis histológico.

También se obtiene muestras del constructo y del tejido óseo de la calota y la tibia, que son depositadas en cassettes y conservadas en formol para posteriormente ser descalcificadas y procesadas como se explica más adelante. (Figura 19)

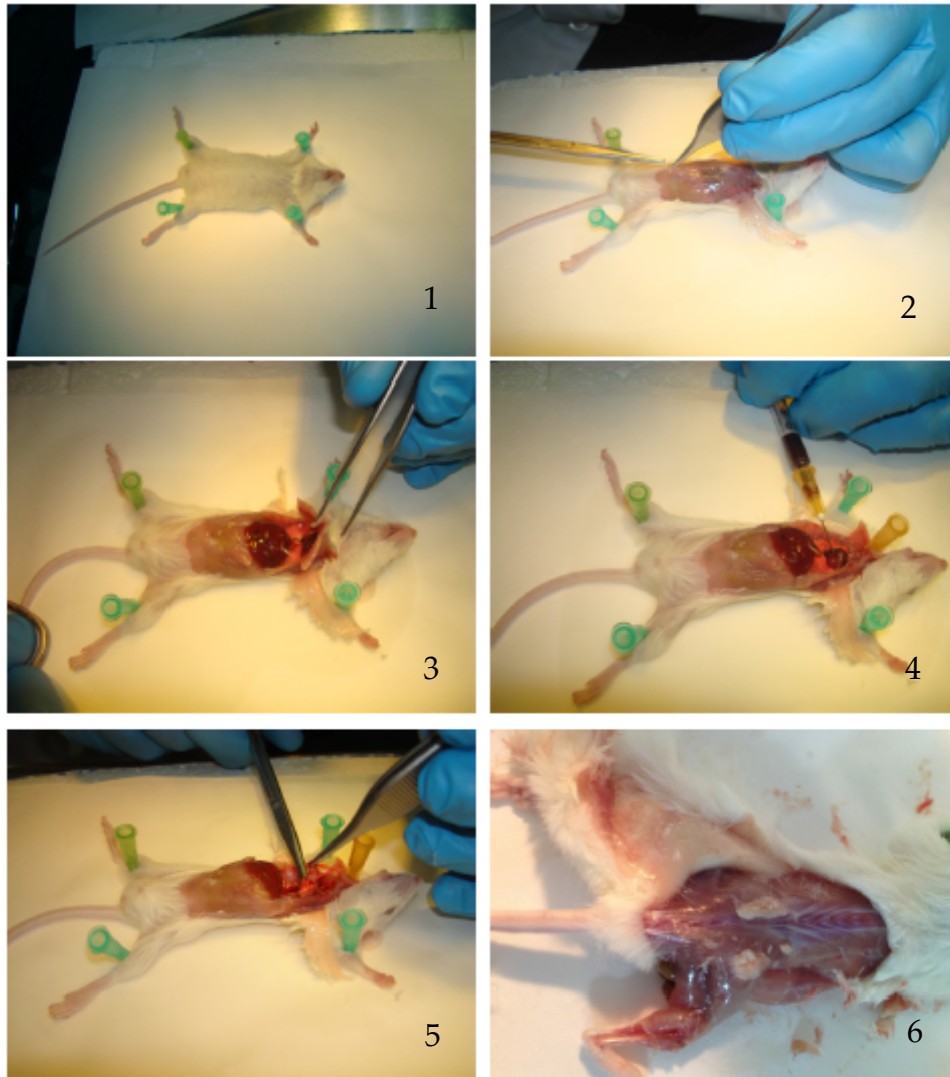


Figura 19. Secuencia necropsia. 1. Colocación ratón decúbiteo supino. 2. Disección de tórax y cavidad abdominal. 3. Sección esternal. 4. Punción Cardíaca. 5 Disección pulmonar. 6. Constructo subcutáneo derecha e intramuscular izquierdo.

La toma de la muestra de médula ósea se realiza tras extirpar una sección de la tibia del animal, se realiza un lavado del conducto medular tibial (Figura 20) arrastrando su contenido con 2ml de PBS en una jeringa de 2ml. El producto obtenido es centrifugado a 2000rpm durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y el pellet se pipetea y se conserva en frío a 4° en un eppendoff de 2ml junto con 1ml de All protect.(Figura 21)

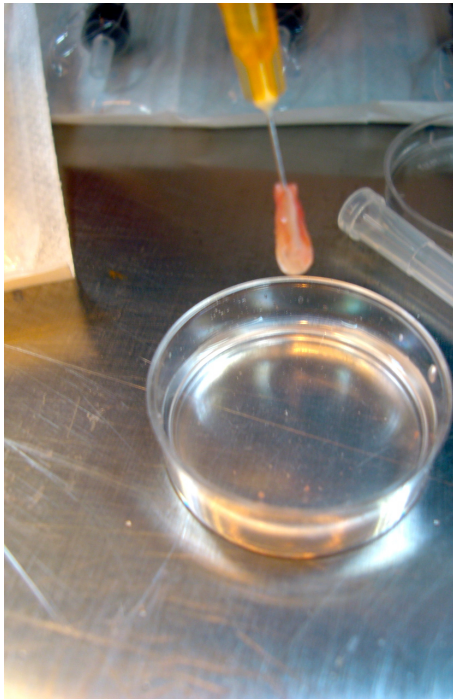


Figura 20 Lavado de la sección de tibia.



Figura 21. Médula ósea extraída.

Todas las muestras son debidamente identificadas (Figura 22).

Todas las necropsias han sido realizadas por la misma persona. Así mismo, se ha analizado macroscópicamente y anotado la presencia de anomalías estructurales o patológicas.

Por tanto para cada ratón NOD/SCID se ha obtenido un total de 8 muestras de PCR-RT y 10 muestras para análisis histológico e inmunohistoquímico.



Figura 22. Muestras debidamente marcadas y conservadas en hielo dispuestas en criomoldes para su posterior análisis PCR-RT.

7. Hoja de recogida de datos

Se ha realizado una hoja de recogida de datos, incluida como Anexo 3, en la que se han identificado y recogido todas las variables del estudio.

8. Estudios de toxicidad aguda.

El protocolo empleado para la evaluación de los ratones NOD/SCID durante la realización del estudio se incluye en el Anexo 7.

8.1 Peso

Se ha recogido el peso de los ratones NOD/SCID medido en gramos.

Los ratones NOD/SCID han sido pesados en la campana de flujo laminar en condiciones de asepsia con balanza de precisión BlauScal AH-3100 (BlauScal®, Barcelona).

La pérdida de peso es uno de los signos más importantes pues refleja un cambio en el consumo de agua y comida implicando un deterioro manifiesto del estado general del animal.

La disminución de peso corporal, se considera como asumible si el descenso es del 5-10% , moderada del 10-20% y severo > al 20%, considerando este descenso como criterio de punto final para realizar eutanasia.

Como variable de evaluación de la toxicidad aguda los ratones NOD/SCID se han pesado de forma previa a la cirugía, a los 5 minutos de la cirugía, a los 30 minutos, 2 horas, 4 horas, y a las 24h y 48h tras la cirugía, tanto los incluidos en el grupo II control (modelo de constructo tipo 2 formado por SSF 0,9%+FTC+MOD) como los incluidos en el grupo I caso (modelo de constructo tipo 1 formado por MSC+FTC+MOD).

Aquellos ratones NOD/SCID sacrificados antes de la finalización del estudio, se registró su peso hasta el día del sacrificio.

8.2 Índice de bienestar animal.

Los ratones fueron monitorizados en el momento de la cirugía para evaluar efectos adversos relacionados con la administración y posibles

reacciones agudas al constructo implantado, deshiscencia o infección de la herida, en los 2 días posteriores a la cirugía (138-141).

La supervisión de los animales se evaluó analizando signos indicativos del bienestar: monitorización del peso corporal, estado de hidratación, apariencia física (piloerección, posición encorvada...), posturas antiálgicas, comportamiento espontáneo y provocado frente a estímulos del investigador.

El objetivo es establecer unos criterios objetivos de punto final donde el sufrimiento del animal en experimentación determine realizar eutanasia. En nuestro experimento decidimos emplear el índice de bienestar animal de Lloyd y Walfenson (140) (Anexo 8) que analiza cinco características: aspecto externo, estado de hidratación, respiración y los comportamientos espontáneo y provocado. Evalúa de forma específica estas características, otorgándoles un valor numérico en función del ítem que cumpla el animal y que detallamos a continuación (140).

Los ratones NOD/SCID han sido valorados en la campana de flujo laminar en condiciones de asepsia de forma previa a la cirugía, a los 5 minutos, 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 24h de la cirugía y a las 48h de la cirugía, tanto los incluidos en el grupo II control (modelo de constructo tipo 2 formado por SSF 0,9%+FTC+MOD) como los incluidos en el grupo I caso (modelo de constructo tipo 1 formado por MSC+FTC+MOD). Aquellos ratones NOD/SCID sacrificados antes de la finalización del estudio, se ha valorado el Índice de bienestar animal hasta el día del sacrificio.

a. Aspecto externo mediante inspección visual:

- ❖ Normal (=0)
- ❖ Pérdida de “grooming” (*autolavado, acicalamiento del animal*) (=1)
- ❖ Secreciones nasales, oculares, óticas (=2)
- ❖ Piloerección o pelo encorvado (=3)
- ❖ Ojos medio cerrados (=4)

b. Estado de hidratación:

- ❖ Normal (=0)
- ❖ Signo del pliegue positivo (=5). *(Al coger de la piel no regresa de manera espontánea a su posición natural quedando una arruga).*

c. Signos clínicos:

- ❖ Frecuencia respiratoria (FR) normal (=0)
- ❖ Aumento leve en FR (=1)
- ❖ Taquipnea con respiración abdominal (=2)
- ❖ Bradipnea con respiración abdominal (=3)
- ❖ Importante respiración abdominal y cianosis (=4)

d. Comportamiento espontáneo:

- ❖ Normal (=0)
- ❖ Cambios mínimos (=1)
- ❖ Menor movilidad y aislamiento, pero alerta (=2)
- ❖ Muy quieto, sin alerta de ningún tipo (=3)

e. Comportamiento provocado:

- ❖ Normal (=0)
- ❖ Respuesta algo exagerada o disminuida a la estimulación (=1)
- ❖ Cambios moderados en comportamiento(=2). *(Por ejemplo la no movilidad con la estimulación).*
- ❖ Reacción muy violenta a la provocación, estado precomatoso, debilidad muy manifiesta (=3).

Así pues la apariencia puntúa 0 si es normal y en escala ascendente hasta 4 si tiene los ojos medio cerrados. El parámetro comportamiento

natural con 0 si es normal y en escala ascendente hasta 3 (no alerta). El parámetro deshidratación puntúa 5. El parámetro respiratorio puntúa 0 si tiene un patrón y frecuencia respiratoria normal y en escala ascendente hasta 4 (cianosis y respiración abdominal). El parámetro comportamiento provocado es 0 normal y en escala ascendente hasta 3 siendo 3 estado débil y precomatoso (140).

El total del Índice de bienestar animal va de una puntuación de 0 a 19. Con la suma de cada uno de los ítems se obtiene un índice de bienestar animal que se corresponde con una actitud a proceder. Aquellos ratones con una puntuación global entre 0-4 se consideran con un estado de bienestar adecuado. En los que la puntuación va de 5 a 9 se recomienda una vigilancia estrecha considerando según el caso la administración de analgesia. Si el ratón presenta una puntuación de 10 a 14 se acepta que el ratón se encuentra en situación de sufrimiento y hay que considerar el sacrificarlo. Un índice de bienestar animal entre 15 y 19 se asocia a un dolor intenso y en ese caso se debe sacrificar de inmediato al animal. El algoritmo de actuación se resume en la tabla siguiente (Tabla 7).

Tabla 7. Medidas de actuación fijadas en función del índice de bienestar animal obtenido en cada animal

índice de bienestar animal	Estado del animal	Actitud a tomar
0-4	Normal	Ninguna
5-9	Afectación leve	Vigilar estrechamente. Valorar analgesia
10-14	Sufrimiento moderado	Considerar sacrificio
15-19	Dolor severo	Sacrificio inmediato

8.3 Parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos.

El análisis de las muestras sanguíneas de los ratones NOD/SCID se ha procesado en una analizadora automática del servicio de hematología (por difracción láser multiángulo) CELL-DYN Sapphire ® Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A. (Figura 23)

Como parte de la evaluación de la toxicidad aguda se realizaron análisis hematológicos y bioquímicos de sangre intracardíaca en los 4 ratones sacrificados que habían recibido el implante subcutáneo formado por (MSC +FTC+MOD): 1 macho y 1 hembra en el 1º día postcirugía y 1 macho y 1 hembra en el 2º día postcirugía .

Se han analizado cuantitativamente tanto parámetros hematológicos como parámetros bioquímicos. Para ello de los 100 µl recolectados en Microvette CB 300 con EDTA (Sarstedt®, Nümbrecht Alemania) destinados al hemograma y análisis por PCR-RT, se cogieron 20 µl de sangre y se traspasaban a un vial eppendorf de 1,5 ml, añadiéndole 180 ul de SSF (dilución 1:10) para alcanzar un volumen de 200 µl.

Los parámetros bioquímicos medidos fueron: glucemia (Glu), urea, creatinina, transaminasa glutámico oxalacética (GOT), transaminasa glutámico-pirúvica (GPT), calcio, fósforo e índice de hemólisis (Ind H). Los parámetros hematológicos fueron: hemoglobina (Hb), plaquetas (PLAQ) , leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, basófilos y eosinófilos.

Los ratones NOD/SCID de 8 a 16 semanas presentan los siguientes valores medios de normalidad en el hemograma: Hb 145-154 g/L, plaquetas 1037-1300 x 10⁹/L, leucocitos 0.41-0.78 x 10⁹/L, neutrófilos 0.2-0.4 x 10⁹/L,

linfocitos $0.14-0.25 \times 10^9/L$, monocitos $0.01-0.03 \times 10^9/L$, eosinófilos $0.05-0.12 \times 10^9/L$ y basófilos $0-0 \times 10^9/L$ (139).

Los dos tubos Microvette CB 300 secos (Sarstedt®, Nümbrecht Alemania) con 100 µl de sangre total cada uno, se centrifugan a 10000 G y 20°C para la obtención del suero y se almacenan en cámara de -80°C hasta su análisis bioquímico en días posteriores. Se determinaron las concentraciones en suero de glucosa, urea, creatinina, GOT, GPT, calcio y fósforo con el autoanalizador Cobas® 8000 (Roche Diagnostics®, Basilea, Suiza) .

Los ratones NOD/SCID de 8 a 16 semanas presentan los siguientes valores medios de normalidad en el análisis bioquímico del suero: glucemia 175-335 mg/dL, urea 34-57 mg/dL, creatinina < 0.5 mg/dL, GOT 55-251 UI/L, GPT 41-64 UI/L, calcio 9.9- 10.7 mg/dL y fósforo 8.6-11.2 mg/dL (2).



Figura 23. Analizadora automática CELL-DYN Sapphire® Abbott Laboratories.

9. Estudios de toxicidad crónica.

La toxicidad crónica fue evaluada mediante los mismos estudios que en fase aguda sacrificando 2 ratones del grupo I Caso (constructo MSC+FTC +MOD) (1 macho y 1 hembra) en la 1^a, 2^a, 5^a, 7^a, 9^a y 12^a postcirugía.

Se evaluó tanto el peso como el índice de bienestar animal; además del análisis hematológico y bioquímico de sangre intracardíaca se ha realizado una evaluación mediante histología en los restantes órganos de los ratones NOD/SCID del estudio.

Debido a la inmunodepresión severa que presenta el modelo murino NOD/SCID se debe vigilar de forma estrecha la aparición de signos infecciosos y el desarrollo de tumores esto se realiza tanto de forma visual como posteriormente con análisis histopatológico.

10. Ensayos de biodistribución.

En cuanto a los ensayos de biodistribución de las células mesenquimales implantadas empleamos la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa por retrotranscripción en tiempo real (PCR-RT) con el fin de identificar de forma precisa la expresión de genes humanos en los órganos y tejidos de los ratones NOD/SCID. Se ha realizado la PCR-RT de hígado, pulmón, bazo, cerebro, riñón, corazón, gónadas, médula ósea y de la sangre periférica.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación selectiva de secuencias específicas de ADN in vitro, utilizando la actividad de la enzima Taq polimerasa partiendo de una cadena molde y un pequeño oligonucleótido inicial (cebador) en presencia de nucleótidos en exceso y magnesio. La PCR cualitativa permite sólo conocer la expresión de dicha secuencia genética a tiempo final tras un determinado número de ciclos mientras que la PCR cuantitativa a tiempo real aporta además la cantidad de expresión génica en un determinado órgano o tejido. La fluorescencia emitida ciclo a ciclo (de ahí el nombre a tiempo real) permite establecer una relación con el número inicial de copias (única, doble o triple), siguiendo una curva patrón establecida con ADNc de concentraciones conocidas.

Esta técnica ha sido realizado por parte del servicio del Biobanco del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria situado en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca al estar enmarcado dentro de un proyecto de investigación preclínico necesario par la realización de un ensayo clínico.

Se realizó análisis PCR-RT de 2 proteínas. La Actina y la β 2microglobulina. Ya que se trata de proteínas constitutivas morfogénicamente conservadas y muy dispares entre ambas especies. Se ha realizado la PCR-RT en todos los órganos descritos tanto para las proteínas humanas como para las murinas. Se ha analizando cada muestra por triplicado, además de ser analizadas en una sonda tipo duplex (se incluye en la misma sonda el análisis para la muestra humana y para la muestra de ratón).

Se empleó para el análisis de PCR-RT el kit Quantifast de Quiagen®.

Las muestras fueron obtenidas tras sacrificar ratones NOD/SCID en el grupo I caso, 2 ratones a las 24horas de la cirugía. Esta misma operación se repite con otros 2 ratones a las 48h, 2 ratones a la semana, 2 ratones a las 2 semanas, 2 ratones a la semana 5, 2 ratones a la semana 7, 2 ratones a la semana 9 y 11 ratones a la 12^o semana.

Se obtiene un total de 8 muestras en cada ratón para su análisis PCR-RT.

Los 5 ratones NOD/SCID del grupo II, control, fueron sacrificados a la 12^a semana y se les realizó, del mismo modo que al resto el análisis de PCR-RT de los mismos órganos.

Se realizaron un total de 720 PCR-RT para la Actina y 720 PCR-RT para la β 2microglobulina.

11. Estudios de eficacia.

11.1 Estudios histológicos hematoxilina-eosina.

Las muestras de los órganos que se conservaron en los cassettes fijados en formol fueron incluidas en parafina por el método habitual y seccionadas con microtomo, obteniendo secciones de entre 5 y 7 μm de grosor. Tres secciones de cada fragmento de órgano incluido en parafina fueron desparafinadas, rehidratadas y teñidas en hematoxilina (Sigma Aldrich®, Madrid, Spain) durante 3 minutos y en eosina (Sigma Aldrich®, Madrid, Spain) durante 5 minutos y montadas.

Todas las secciones óseas fueron obtenidas mediante una fresa de disco (Komet®, Brasseler Group, Lemgo, Alemania) para pieza de mano.

Las muestras de piezas óseas fueron descalcificadas por inmersión en una solución descalcificadora comercial (TBD-2, Thermo, Madrid, España), durante un mínimo de 16 horas.

Posteriormente las muestras se procesaron e incluyeron en parafina mediante procesado convencional. De cada una de ellas, se obtienen secciones de 3 μm de espesor para análisis histopatológico que son teñidas con hematoxilina-eosina. Para establecer la naturaleza de los tejidos descalcificados, las secciones procedentes de material óseo también son teñidas con Tricrómico de Masson.

El protocolo de análisis fue realizado mediante un barrido de la muestras por microscopía óptica que consistía en buscar la presencia de tejido óseo humano neoformado a partir del constructo. Para ello se estableció una graduación que va desde un valor 0 que representa la

ausencia de tejido valorable hasta el 10 que indica la presencia de tejido óseo laminar.

Los distintos valores intermedios son:

0= No Valorable.

1= Material cristaloides.

2= Material cristaloides asociado a infiltrado inflamatorio.

3= Material cristaloides asociado a zona de proliferación conectiva.

4= 2 y 3.

5= Material denso acidófilo y homogéneo similar a tejido óseo laminar.

6= Material similar a tejido óseo laminar asociado a zonas de proliferación conectiva.

7= Material similar a tejido óseo laminar asociado a zonas de organización.

8= 6 y 7.

9= Diferenciación cartilaginosa.

10 = Tejido óseo laminar.

11.2 Inmunohistoquímica con marcaje anti-osteocalcina humanos.

Los cortes óseos del implante fueron fijados durante 48 horas en formol al 4% y posteriormente descalcificados durante 7 días en ácido hipoclorhídrico al 10% y formol al 4% (Osteomol®, Laboratorios Merck, Darmstadt, Alemania). 4 secciones del micrómetro de cada muestra fueron obtenidas para realizar la tinción inmunohistoquímica. Se empleó un anticuerpo policlonal isotipo IgG de conejo anti-osteocalcina humana LS-C124317 (LsBio®, Seattle, USA).

Este anticuerpo reconoce específicamente un epítipo de la región C-terminal de la osteocalcina, conseguido tras sensibilización frente a un péptido sintético originado a partir de la secuencia de la osteocalcina humana y no presenta reactividad cruzada con otras especies.

Se empleó kit de tinción automático Dako EnVision Flex® (Dako®, Carpinteria, USA) utilizando el anticuerpo a una dilución de 1:2500.

Las secciones fueron reveladas con 2,2,5 diaminobencidina, que produce un precipitado marrón oscuro, que se corresponde con las células positivas para osteocalcina; que presentan una morfología celular cuboide compatibles con osteoblastos humanos en fase activa.

En cada muestra del implante se realizaron análisis tanto cualitativo (presencia de células positivas para osteocalcina o no) como cuantitativo mediante el recuento absoluto de células positivas para osteocalcina humana en 10 campos a gran aumento (400%) usando un microscopio estándar Zeiss Axio A10® (Carl Zeiss®, Alemania) y así poder realizar comparaciones entre los dos grupos.

El examen histopatológico será realizado por el mismo observador para disminuir la variabilidad interobservador.

12. Análisis estadístico.

Se realizó mediante el programa informático SPSS® versión 19.0 en español (IBM SPSS Statistics®).

Incluyendo un análisis descriptivo de las variables cuantitativas como son las medias, la desviación estándar y el intervalo de confianza (IC) al 95%.

La relación entre las variables ha sido analizada mediante el contraste de coeficiente de correlación de Pearson.

Para la valoración de la relación entre las variables cuantitativas normales y cualitativas se ha empleado el análisis de la varianza para medias repetidas completada con la comparación de medias 2 a 2 de la T de Student previo análisis de varianzas.

Para la valoración de la relación entre las variables cuantitativas no normales y cualitativas se ha empleado la comparación de 2 medias mediante diferentes test no exactos entre ellas la U de Mann-Witney.

En todos los casos se ha considerado que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando el valor de la p fue inferior a 0,05.

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Resultados

Resultados.

Se ha incluido un total de 30 ratones NOD/SCID. 25 ratones están incluidos en el grupo I (caso). A estos ratones les ha sido implantado de forma subcutánea e intramuscular el modelo de constructo tipo 1 formado por MSC humanas sembradas en fosfato tricálcico que mezclamos con matriz ósea desmineralizada (FTC+MSC+MOD).

Los otros 5 ratones NOD/SCID restantes han sido incluidos en el grupo II (control). A estos ratones se les ha sido implantado también de forma subcutánea e intramuscular el modelo de constructo tipo 2 formado por suero salino fisiológico al 0,9% con fosfato tricálcico que mezclamos con matriz ósea desmineralizada (FTC+SSF 0,9%+MOD).

Los datos registrados de los ratones NOD/SCID en función de su número de identificación se pueden observar en la siguiente tabla (tabla 8).

Tabla 8. “Registro de datos de ratones NOD/SCID en el que figura el número de identificación (ID) con su código numérico asignado, género, código de biobanco asignado, fecha de la cirugía y rama de tratamiento.

Registro de datos de ratones NOD/SCID					
ID RATÓN	CÓDIGO LABORATORIO	GÉNERO	CÓDIGO BIOBANCO	CONSTRUCTO	FECHA DE CIRUGÍA DE IMPLANTE
1	1203D2401	MACHO	12N64	FTC+MSC+MOD	03/12/2012
2	1203D2402	HEMBRA	12N65	FTC+MSC+MOD	03/12/2012
3	1210D4801	MACHO	12N68	FTC+MSC+MOD	03/12/2012
4	1210D4802	HEMBRA	12N69	FTC+MSC+MOD	03/12/2012
5	1203D0101	MACHO	12N66	FTC+MSC+MOD	03/12/2012
6	1203D0102	HEMBRA	12N67	FTC+MSC+MOD	03/12/2012
7	1203D0202	HEMBRA	12N75	FTC+MSC+MOD	03/12/2012
8	1203D0201	MACHO	12N113	FTC+MSC+MOD	10/12/2012
9	1203D0501	HEMBRA	12N76	FTC+MSC+MOD	03/12/2012
10	1203D0502	MACHO	12N77	FTC+MSC+MOD	03/12/2012
11	1203D0701	MACHO	12N81	FTC+MSC+MOD	10/12/2012
12	1203D0702	HEMBRA	12N80	FTC+MSC+MOD	10/12/2012
13	1210D0901	MACHO	12N105	FTC+MSC+MOD	10/12/2012
14	1210D0902	HEMBRA	13N17	FTC+MSC+MOD	10/12/2012
15	1210D1207	HEMBRA	12N119	FTC+MSC+MOD	10/12/2012
16	1203D1215	MACHO	12N114	FTC+MSC+MOD	10/12/2012
17	1210D1208	HEMBRA	12N117	FTC+MSC+MOD	03/12/2012
18	1203D1206	MACHO	12N109	FTC+MSC+MOD	03/12/2013
19	1203D1204	HEMBRA	12N106	FTC+MSC+MOD	03/12/2014
20	1203D1205	MACHO	12N110	FTC+MSC+MOD	03/12/2015
21	1210D1209	HEMBRA	12N115	FTC+MSC+MOD	03/12/2016
22	1203D1203	MACHO	12N107	FTC+MSC+MOD	10/12/2012
23	1210D1211	HEMBRA	12N118	FTC+MSC+MOD	10/12/2013
24	1210D1214	MACHO	12N111	FTC+MSC+MOD	10/12/2014
25	1203D1216	HEMBRA	12N112	FTC+MSC+MOD	10/12/2015
26	1203D1207	MACHO	12N116	FTC+SSF 0.9%+MOD	10/12/2012
27	1210D1210	HEMBRA	12N74	FTC+SSF 0.9%+MOD	03/12/2012
28	1210D1206	HEMBRA	12N85	FTC+SSF 0.9%+MOD	10/12/2012
29	1203D1201	MACHO	12N84	FTC+SSF 0.9%+MOD	10/12/2012
30	1203D1202	HEMBRA	12N108	FTC+SSF 0.9%+MOD	10/12/2013

MSC: Células madre mesenquimales. FTC: Fosfato tricálcico. MOD: Matriz ósea desmineralizada. SSF 0,9%: Suero salino fisiológico.

1.-Evaluación de clínica precirugía de implante del constructo.

1.1 Índice de bienestar animal.

El 100% de los ratones NOD/SCID presentó un índice de bienestar animal de 0 desde la fecha de la recepción hasta el momento previo a la cirugía.

1.2. Peso.

Se ha realizado el análisis del peso previo a la cirugía en todos los ratones NOD/SCID.

El peso medio ha sido de 20,6 g. (19,9 - 21,3) g. Los ratones NOD/SCID machos han tenido una media de peso de 21,9 g. (20,6 - 23,1) g. Las hembras han presentado una media de peso de 19,4 g. (18,7 - 20,2) g. Los resultados se pueden observar en la tabla 9.

Se han observado diferencias significativas en el peso en relación al sexo ($p=0,001$).

Tabla 9. "Peso medio (IC) de ratones NOD/SCID previo a la cirugía estratificado por sexo.

Peso (g.) de ratones NOD/SCID precirugía según sexo (Test T de Student)			
	RATONES NOD/SCID MACHOS	RATONES NOD/SCID HEMBRAS	P
PESO MEDIO Precirugía (G.)	21,9	19,4	0,001
(IC)	20,6-23,1	18,7-20,2	

Con respecto al peso medio según el modelo de constructo empleado. Los ratones NOD/SCID a los que se les implantó el modelo de constructo 1 (FTC+MSC+MOD grupo caso) han tenido una media de peso de 20,6 g. (19,8 - 21,5) g. y a los ratones a los que se les implantó el constructo tipo 2 (grupo control FTC+SSF 0,9%+ MOD) han tenido una media de peso de 20,4 g. (18,3 - 22,5) g.

No se han hallado diferencias significativas en las medias de los pesos de los ratones NOD/SCID en función del grupo de tratamiento (I caso vs. II control) ($p=0,820$) (tabla 10)

Tabla 10. Peso medio (IC) de ratones NOD/SCID previo a la cirugía estratificado por modelo de constructo implantado.

PESO (g.) DE RATONES NOD/SCID Precirugía SEGÚN MODELO DE CONSTRUCTO IMPLANTADO (Test U de Mann-Whitney)			
	CONSTRUCTO FTC+MSC +MOD	CONSTRUCTO FTC+SSF 0,9%+MOD	P
PESO MEDIO Precirugía (G.)	20,6	20,4	0,820
(IC)	19,8-21,5	18,3-22,5	

RESUMEN Evaluación de clínica precirugía de implante del constructo.

- El índice precirugía de los ratones NOD/SCID ha sido en el 100% de los ratones de 0.
- Se ha observado diferencias estadísticamente significativas en el peso precirugía entre ratones macho y ratones hembra ($p=0,001$).
- No se han observado diferencias estadísticamente significativas en el peso precirugía entre ratones NOD/SCID del grupo I y ratones NOD/SCID del grupo II ($p=0,820$).

2. Evaluación cirugía de implante del constructo.

Las intervenciones a los 30 ratones NOD/SCID se han realizado en 2 días diferentes, siendo interpretado cada día como el día 0 de inicio de seguimiento en cada ratón.

A los 25 ratones del grupo I caso se les ha implantado de forma subcutánea el modelo de constructo tipo 1 formado por (MSC+FTC+MOD) y de forma intramuscular el modelo de constructo tipo 1 en el lado contralateral.

A los 5 ratones del grupo II control se les ha implantado, de igual manera, de forma subcutánea y de forma intramuscular el modelo de constructo tipo 2 formado por (SSF 0,9%+FTC+MOD).

No se ha registrado ninguna incidencia durante la cirugía.

3. Evaluación de toxicidad aguda.

La toxicidad aguda, entendida la misma como la provocada de forma subsecuente al procedimiento o cirugía ha sido evaluada clínicamente mediante su estrecha observación clínica.

3.1.- Índice de bienestar animal.

La observación clínica de los ratones ha consistido en realizar mediciones de frecuencia cardíaca y de la frecuencia respiratoria, control semanal del peso, observación y anotación de las reacciones locales en el sitio de la cirugía, observación y anotación de las posibles reacciones sistémicas tras la intervención, así como el registro de los fallecimientos producidos de forma aguda o crónica tras la cirugía.

El total del índice de bienestar animal va de una puntuación de 0, en el caso que no exista ninguna alteración a 19, que es indicativo de sufrimiento animal.

Tras la realización de la cirugía y 2 horas después de la misma, dando margen a la eliminación completa del anestésico inhalado cuya vida media es de 15 minutos, el índice del 100% de los ratones ha sido de 0.

El índice igualmente ha sido de 0 al 1º, 2º día postcirugía en el 100% de los casos.

Se ha observado, en un ratón, la deshiscencia de un punto de la herida quirúrgica que se resolvió de forma espontánea a la semana.

El índice de toda la muestra de ratones NOD/SCID, durante todo el periodo de estudio, entre la 1º hasta la semana 12 ha sido de 0 en el 100% de los casos.

Tras la realización de la cirugía no se ha contabilizado ningún fallecimiento atribuible a la técnica, al implante del constructo ni tampoco de forma espontánea o subsecuente a alguna patología.

3.2.- Peso.

La media de peso de los ratones NOD/SCID en el 1º y 2º día postcirugía han sido 20,5 g. (19,6 - 21,4) g. y 20,8 g. (19,9 - 21,6) g. respectivamente.

No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre el peso previo a la cirugía y el peso de los ratones en el 1º día post-operatorio ($p=0,35$) ni en el 2º día ($p=0,17$). Tampoco se han objetivado diferencias estadísticamente significativas entre el 1º y 2º día post- cirugía ($p=0,46$).

En términos de variación ponderal en términos globales tampoco hemos observado diferencias estadísticamente significativas al comparar la variación ponderal entre la recepción y los días 1º postcirugía y entre el 1º y 2º día post-operatorio ($p=0,17$.) (Ver tabla 11).

Tabla 11. Variación de peso ponderal en términos globales de ratones NOD/SCID en los primeros dos días postcirugía.

Variación de peso ponderal ratones NOD/SCID en los primeros dos días postcirugía	
Período	Variación ponderal ratones NOD/SCID (g.)
	Media (IC)
Previo a cirugía vs 1º día postcirugía	0,1 (+0,2,+0,5)
Previo a cirugía vs 2º día postcirugía	-0,1 (-0,4, +0,1)
1º día postcirugía vs 2º día postcirugía	-0,2 (-0,4 , 0)

La evolución de las medias de peso previos a la cirugía estratificadas por sexo de los ratones NOD/SCID en los días 1º y 2º postcirugía se puede observar en el gráfico siguiente (Figura 24).

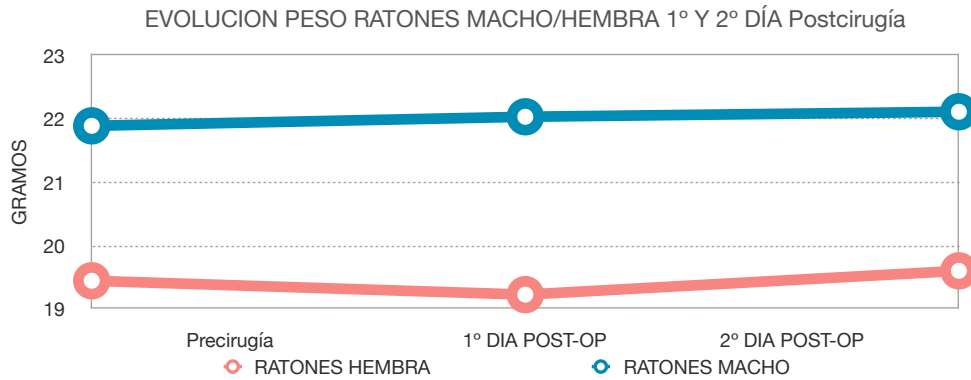


Figura 24. Evolución de peso medio de ratones NOD/SCID estratificado por sexo al 1º y 2º día postcirugía.

Se han observado diferencias estadísticamente significativas al aplicar la comparación de dos medias mediante la T de Student combinada previa comparación de varianzas en los pesos entre los ratones machos y las hembras en los 1º y 2º día postoperatorio (Ver Tabla 12).

Tabla 12. “Peso medio (g.) de ratones NOD/SCID estratificado por sexo implantado precirugía 1º y 2º día postcirugía”.

Peso (g.) de ratones NOD/SCID precirugía y en los primeros dos días postcirugía (Test T de Student)			
DÍA	RATONES MACHOS	RATONES HEMBRAS	P
	Media	Media	
Precirugía	21,9	19,4	0,001
1ºDÍA POSTCIRUGÍA	22	19,2	0,001
2ºDÍA POSTCIRUGÍA	22,1	19,6	0,002

Si realizamos la estratificación según el modelo de constructo implantado. La evolución de las medias de peso previos a la cirugía estratificadas por constructo de los ratones NOD/SCID en los días 1º y 2º postcirugía se puede observar en el gráfico siguiente (Figura 25).

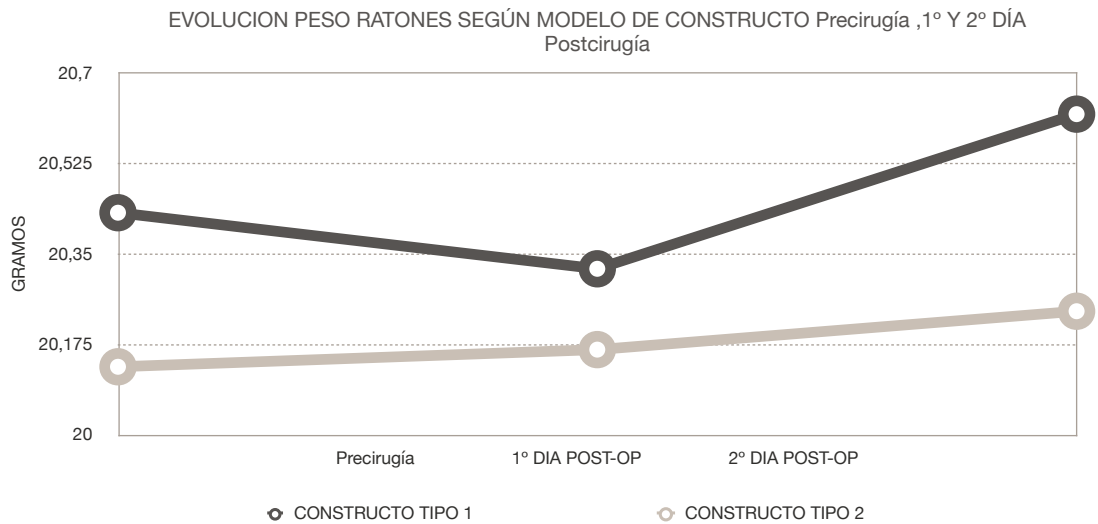


Figura 25. Evolución de peso medio de ratones NOD/SCID estratificado por constructo al 1º y 2º día postcirugía.

No se han observado diferencias estadísticamente significativas al aplicar la comparación de dos medias mediante la T de Student combinada previa comparación de varianzas en los pesos según el constructo implantado los 1º y 2º día postoperatorio (Ver Tabla 13).

Tabla 13. Peso medio (g.) de ratones NOD/SCID estratificado por modelo de constructo implantado precirugía 1° y 2° día postcirugía.

Peso (g.) de ratones NOD/SCID precirugía y en los primeros dos días postcirugía (Test U de Mann-Whitney)			
DÍA	CONSTRUCTO (FTC+MSC +MOD)	CONSTRUCTO (FTC+SSF 0,9% +MOD)	P
	Media	Media	
Precirugía	20,6	20,4	0,820
1ºDÍA POSTCIRUGÍA	20,5	20,4	0,905
2ºDÍA POSTCIRUGÍA	20,8	20,5	0,755

Al evaluar la ganancia ponderal estratificada por sexo, observamos una ganancia de peso en el 1° día postcirugía en los ratones hembra 0,2g. (-0,4 , +0,8) g. con respecto a los machos que perdían una media de 0,1g. (-0,1 , +0,1) g. Aunque esta diferencia no ha sido estadísticamente significativa ($p=0,31$).

Al 2° día postcirugía esta diferencia en la ganancia de peso en las hembras (-0,13) se equiparaba a los machos (-0,1) ($p=0,94$).

No se han hallado variaciones estadísticamente significativas entre los ratones macho y los ratones hembra con respecto al incremento ponderal entre los días 1° y 2° postcirugía ($p=0,11$) (Ver Tabla 14).

RESULTADOS

Tabla 14. Variación de peso ponderal de ratones NOD/SCID estratificado por sexo, precirugía y en los primeros dos días postcirugía (Test T Student).

Variación de peso ponderal ratones NOD/SCID en los primeros dos días postcirugía (Test T de Student)			
Período	Ratones machos (g.)	Ratones hembras (g.)	P
	Media (IC)	Media (IC)	
Previo a cirugía vs 1º día postcirugía	-0,1 (-0,1 , +0,1)	0,2 (-0,4 , +0,8)	0,312
Previo a cirugía vs 2º día postcirugía	-0,1 (-0,1 , 0)	-0,1 (-0,6 , +0,3)	0,947
1º día postcirugía vs 2º día postcirugía	-0,1 (-0,1 , 0)	-0,4 (-0,7 , -0,1)	0,118

Si realizamos el mismo análisis según el modelo de constructo implantado, no se han hallado diferencias estadísticamente significativas en las variaciones ponderales observadas en el 2º día postcirugía con respecto al peso inicial ($p=0,932$), ni en las variaciones ponderales observadas el 1º día postcirugía con respecto al peso inicial ($p=0,823$) ni en la variación ponderal del 1º día postcirugía con respecto al 2º día postcirugía ($p=0,396$) (Tabla 15)

Tabla 15. Variación de peso ponderal de ratones NOD/SCID estratificado por constructo, precirugía y en los primeros dos días postcirugía (Test T Student).

Variación de peso ponderal ratones NOD/SCID en los primeros dos días postcirugía (Test T Student)			
Período	CONSTRUCTO (FTC+MSC+MOD)	CONSTRUCTO (FTC+SSF 0,9% +MOD)	P
	Media (IC)	Media (IC)	
Previo a cirugía vs 1º día postcirugía	+0,1 (-0,3 , +0,5)	0 (-0,1 , +0,1)	0,823
Previo a cirugía vs 2º día postcirugía	-0,1 (-0,4 , +0,2)	-0,1 (-0,2 , 0)	0,932
1º día postcirugía vs 2º día postcirugía	-0,3 (-0,5 , -0,1)	-0,1 (-0,2 , 0)	0,396

3.3.- Parámetros hematológicos.

Los 4 ratones NOD/SCID del grupo I (caso) sacrificados el 1º y 2º día postcirugía han presentado los siguientes parámetros en el hemograma, expresados en media (mínimo, máximo): hemoglobina 13,4 g/dl (7,4 - 19,5), plaquetas $614 \times 10^9/L$ (47 - 1182), leucocitos $10,7 \times 10^9/dl$ (4,4 - 17,1], neutrófilos $2,7 \times 10^9/dl$ (0,9 - 4,4), linfocitos $0,6 \times 10^9/dl$ (0,2 - 1), monocitos $0,5 \times 10^9/dl$ (0 - 2), eosinófilos $1 \times 10^9/dl$ (0,1 - 3) y basófilos $0 \times 10^9/dl$ [0-0].

Debido a la trombopenia objetivada en los hemograma, decidimos evaluar la morfología plaquetar murina en sangre periférica a estas muestras con el fin de comprobar la trombopenia. En los frotis observamos numerosos agregados plaquetarios tal y como se observa en la siguiente Figura 26.

Los mismos 4 ratones sacrificados el 1º y 2º día postcirugía han presentado los siguientes parámetros bioquímicos en suero, expresados en media (IC): glucemia 300 mg/dl (284 - 316), urea 37,5 mg/dl (32,6 - 42,4), GOT 255 UI/L (105 - 404), GPT 38 (8 - 68) UI/L, calcio 10 mg/dl (9,2 - 10,8) y fósforo 10,3 mg/dl (7,6 - 12,9).

La determinación de creatinina fue inferior al límite de detección del aparato en todos los casos (<0.17 mg/dl).

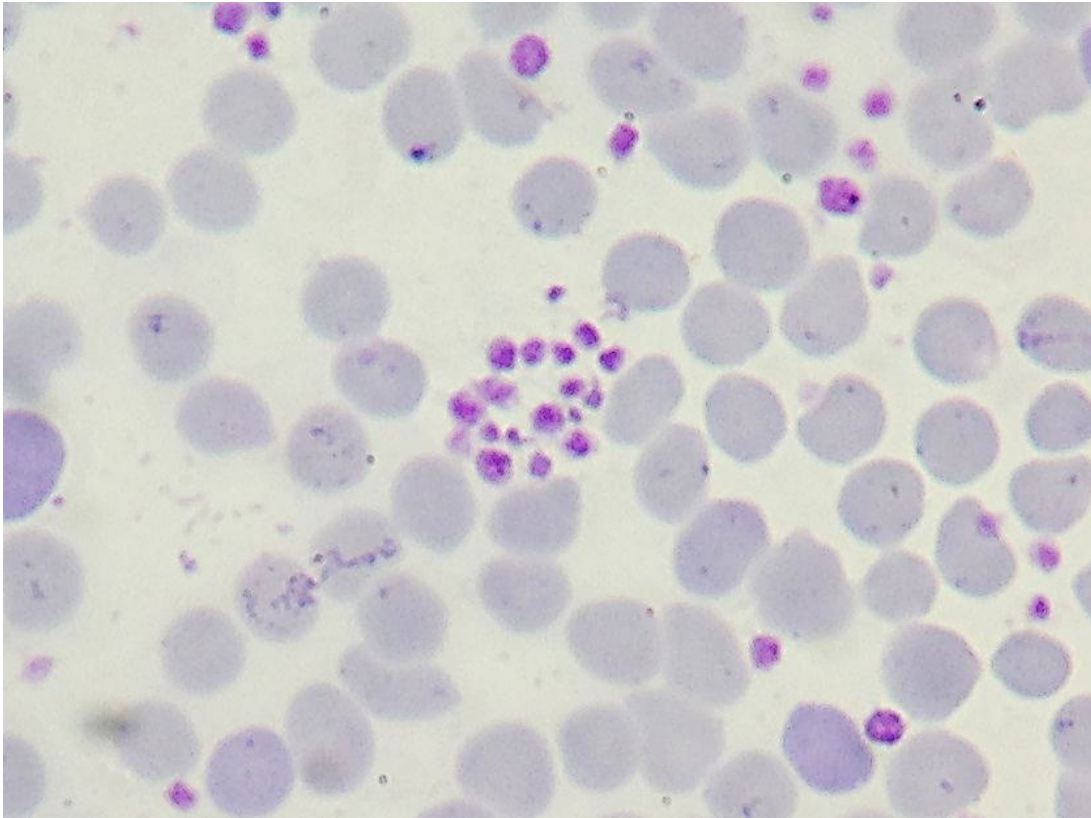


Figura 26 Fotografía agregado plaquetario de sangre periférica de ratón NOD/SCID (Hematoxilina-Eosina 200x).

3.4.- Histología en ratones NOD/SCID del grupo I (caso) sacrificados tras 24h. y 48h. de la cirugía.

No se han objetivado alteraciones histológicas en corazón, pulmón, hígado, riñón, gónadas (ovarios y testículos), cerebro, calota y médula ósea en los 2 ratones NOD/SCID del grupo I (caso) sacrificados a las 24 horas de la cirugía.

Tampoco se ha objetivado ninguna alteración a nivel microscópico ni histológico en ningún órgano de los 2 ratones NOD/SCID del grupo I (caso) sacrificados en el 2º día postcirugía.

RESUMEN Evaluación de toxicidad aguda.

- El índice de bienestar animal el día de la cirugía, a los 15 minutos, 24h y 48h de los ratones NOD/SCID fue 0 en el 100% de los ratones.
- No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre el peso previo a la cirugía y el peso de los ratones el 1º día postoperatorio ($p=0,35$), ni con el 2º día ($p=0,17$).
- Tampoco se han objetivado diferencias estadísticamente significativas entre el 1º y 2º día postcirugía ($p=0,46$).
- Se han observado diferencias estadísticamente significativas en los pesos entre los ratones machos y los ratones hembras en los 1º y 2º día postoperatorio ($p<0,05$).
- No se han observado diferencias estadísticamente significativas en los pesos de los ratones según el constructo implantado los 1º y 2º día postoperatorio.
- No se han hallado variaciones estadísticamente significativas entre los ratones macho y los ratones hembra con respecto al incremento ponderal de peso entre los días precirugía y 1º día postcirugía ni entre los días 1º y 2º postcirugía.
- No se han hallado variaciones estadísticamente significativas entre los ratones del grupo I (caso) y los ratones del grupo II (control) con respecto al incremento ponderal de peso entre los días precirugía y 1º día postcirugía ni entre los días 1º y 2º postcirugía.
- No se han objetivado alteraciones histológicas en corazón, pulmón, hígado, riñón, gónadas (ovarios y testículos), cerebro, calota y médula ósea en ninguno de los 4 ratones NOD/SCID del grupo I (caso) sacrificados a las 24 horas y 48 horas de la cirugía.

4. Ensayos de toxicidad crónica.

Si entendemos como periodo de toxicidad crónica el comprendido entre las 72 horas postoperatorias hasta las finalización del estudio a las 12 semanas, se han evaluado un total de 26 ratones NOD/SCID; 11 ratones pertenecientes al grupo I caso (modelo de constructo implantado FTC+MSC +MOD) y 5 ratones pertenecientes al grupo II control (modelo de constructo implantado FTC+ SSF 0,9%+ MOD).

No se ha registrado ningún fallecimiento espontáneo en los 26 ratones NOD/SCID pertenecientes a esta fase durante el período de evaluación de toxicidad crónica.

4.1 Índice de bienestar animal.

La posible toxicidad crónica de los animales se ha evaluado mediante la observación clínica de los mismos.

Esta valoración clínica crónica ha sido realizada en los animales a la semana de la cirugía y tras las semanas 2, 5, 7, 9 y 12 en todos los animales. Igualmente se realizó, previo a su sacrificio, en aquellos que debía ser necropsiados.

El 100% de los ratones ha obtenido una puntuación índice de bienestar animal de 0.

La evaluación de la toxicidad crónica se ha realizado en 26 ratones a la semana de la cirugía, 24 ratones a las 2 semanas de la cirugía, 22 ratones a las 5 semanas de la cirugía, 20 ratones a las 7 semanas de la cirugía, 18 ratones a las 9 semanas de la cirugía y 16 ratones a las 12 semanas de la cirugía.

RESULTADOS

Los datos registrados del índice de bienestar animal de los ratones NOD/SCID se pueden observar en la siguiente tabla (Tabla 16).

Tabla 16. Registro de datos de ratones NOD/SCID en el que figura el sexo, tipo de constructo y índice de bienestar animal obtenido en el período de evaluación de toxicidad crónica.

Índice de bienestar animal en período de evaluación de toxicidad crónica.								
ID RATÓN	Sexo	CONSTRUCTO	STC 1S	STC 2S	STC 5S	STC 7S	STC 9S	STC 12S
5	MACHO	FTC-MSC-MOD	0	-	-	-	-	-
6	HEMBRA	FTC-MSC-MOD	0	-	-	-	-	-
7	HEMBRA	FTC-MSC-MOD	0	0	-	-	-	-
8	MACHO	FTC-MSC-MOD	0	0	-	-	-	-
9	HEMBRA	FTC-MSC-MOD	0	0	0	-	-	-
10	MACHO	FTC-MSC-MOD	0	0	0	-	-	-
11	MACHO	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	-	-
12	HEMBRA	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	-	-
13	MACHO	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	-
14	HEMBRA	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	-
15	HEMBRA	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	0
16	MACHO	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	0
17	HEMBRA	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	0
18	MACHO	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	0
19	HEMBRA	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	0
20	MACHO	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	0
21	HEMBRA	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	0
22	MACHO	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	0
23	HEMBRA	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	0
24	MACHO	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	0
25	HEMBRA	FTC-MSC-MOD	0	0	0	0	0	0
26	MACHO	FTC-SSF 0.9%-MOD	0	0	0	0	0	0
27	HEMBRA	FTC-SSF 0.9%-MOD	0	0	0	0	0	0
28	HEMBRA	FTC-SSF 0.9%-MOD	0	0	0	0	0	0
29	MACHO	FTC-SSF 0.9%-MOD	0	0	0	0	0	0
30	HEMBRA	FTC-SSF 0.9%-MOD	0	0	0	0	0	0

MSC: Células madre mesenquimales FTC: Fosfato tricálcico MOD: Matriz ósea desmineralizada SSF 0,9%: Suero salino fisiológico al 0,9% STC: Índice de bienestar animal - :No realizado el índice de bienestar animal debido a sacrificio previo

1s: 1 semana 2s: 2 semanas 5s: 5 semanas 7s: 7 semanas 9s: 9 semanas 12s: 12 semanas

4.2 Peso.

La evolución de la media (IC) en peso de todos los ratones NOD/SCID por semanas durante todo el seguimiento de la toxicidad crónica ha sido la siguiente:

1ª semana 21,38 g. (20,47 ; 22,29) g.

2ª semana 22,12 g. (21,10 ; 23,14) g.

5ª semana 23,62 g. (22,44 ; 24,80) g.

7ª semana 23,55 g. (22,18 ; 24,92) g.

9ª semana 24,71 g. (23,33 ; 26,08) g.

12ª semana 25,47 g. (23,46 ; 27,48) g.

Se puede observar en el Figura 27

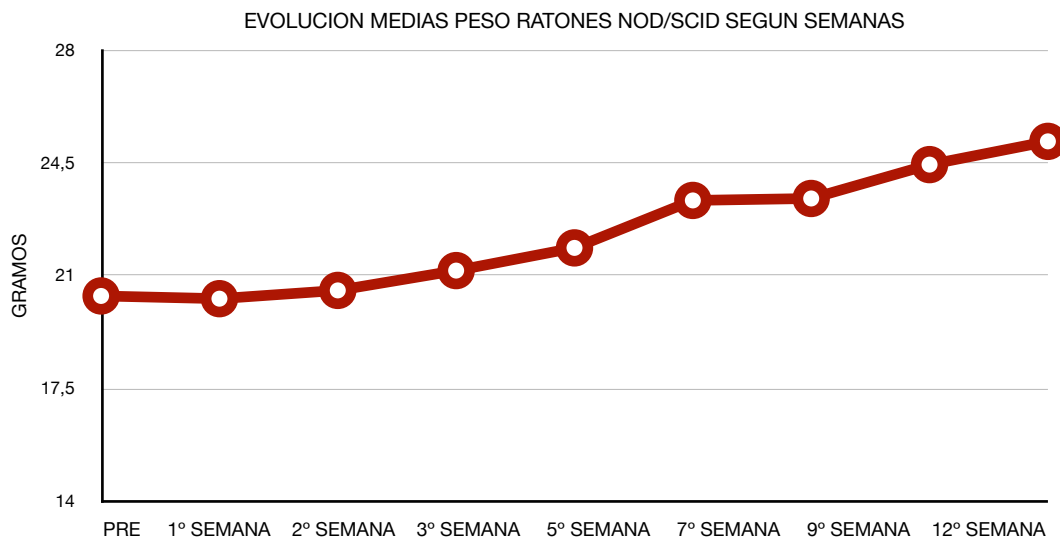


Figura 27. Medias en gramos de pesos de los ratones NOD/SCID del estudio, precirugía, a la semana de la cirugía, a las 2 semanas, a las 5, 7, 9 y 12 semanas de la cirugía.

La ganancia de peso que se ha ido produciendo en las semanas sigue un modelo lineal que es estadísticamente significativo con una $p=0,0001$.

La evolución de las medias de peso de los ratones NOD/SCID machos y hembras por semanas durante todo el tiempo de seguimiento se pueden observar en la figura 28.

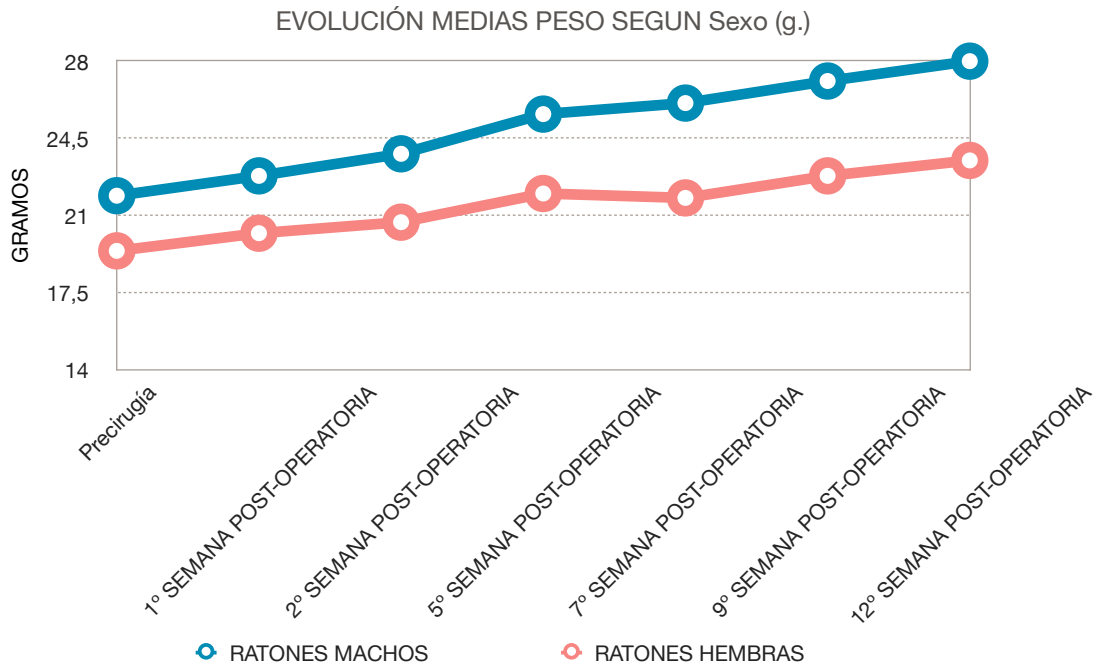


Figura 28. Medias en gramos de pesos de los ratones NOD/SCID machos y de los ratones NOD/SCID hembras del estudio, precirugía, a la semana de la cirugía, a las 2 semanas, a las 5, 7, 9 y 12 semanas de la cirugía.

Se han objetivado diferencias estadísticamente significativas entre los pesos de los ratones NOD/SCID machos y hembras en todas las semanas de forma que sigue un modelo lineal es estadísticamente significativo con una $p=0,009$.

En la tabla número 17, se detalla la evolución por pares.

Tabla 17. Peso medio (g.) de ratones NOD/SCID estratificado por sexo durante el periodo de evaluación de toxicidad crónica.

	MEDIAS DE PESO (g.)						
	Precirugía	1ª SEMANA postoperatoria	2ª SEMANA POST-OPERATORIA	5ª SEMANA POST-OPERATORIA	7ª SEMANA POST-OPERATORIA	9ª SEMANA POST-OPERATORIA	12ª SEMANA POST-OPERATORIA
MEDIA PESO MACHOS (g.)	21,9	22,8	23,8	25,6	26,1	27,1	28
MEDIA PESO HEMBRAS (g.)	19,4	20,2	20,7	22	21,8	22,8	23,5
p	0,009	0,018	0,001	0,001	0,417	0,001	0,004

La evolución de las medias de peso de los ratones NOD/SCID en función del constructo implantado por semanas durante todo el tiempo de seguimiento de evaluación de toxicidad crónica se pueden observar en la figura 29. No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos de los ratones NOD/SCID en función del constructo implantado, no siguiendo por tanto una evolución lineal estadísticamente significativa ($p=0,217$) (Tabla 18).

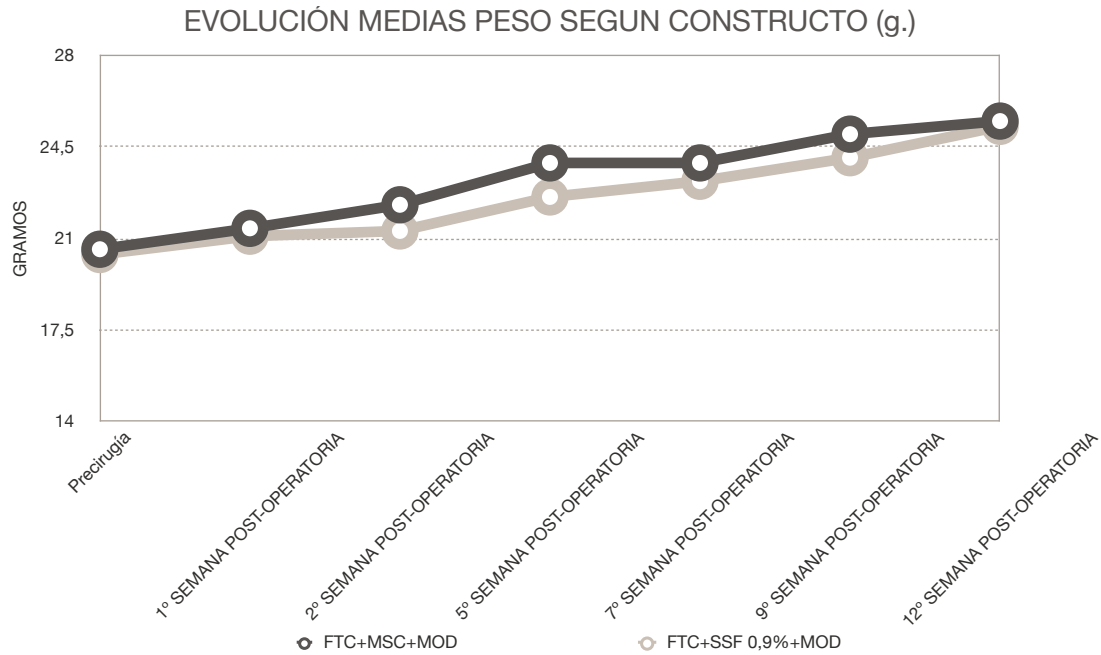


Figura 29 Medias en gramos de pesos de los ratones NOD/SCID del grupo I caso y de los ratones NOD/SCID del grupo II control del estudio, precirugía, a la semana de la cirugía, a las 2 semanas, a las 5, 7, 9 y 12 semanas de la cirugía.

Tabla 18. Peso medio (g.) de ratones NOD/SCID estratificado por modelo de constructo implantado durante el periodo de evaluación de toxicidad crónica.

	MEDIAS DE PESO (g.)						
	Precirugía	1ª SEMANA POST-OPERATORIA	2ª SEMANA POST-OPERATORIA	5ª SEMANA POST-OPERATORIA	7ª SEMANA POST-OPERATORIA	9ª SEMANA POST-OPERATORIA	12ª SEMANA POST-OPERATORIA
FTC +MSC +MOD	20,6	21,4	22,3	23,9	23,9	25	25,5
FTC +SSF 0,9% +MOD	20,4	21,1	21,3	22,6	23,2	24,1	25,3
p	0,001	0,001	0,007	0,009	0,008	0,029	0,2

4.3 Parámetros hematológicos.

La media, IC (intervalo de confianza) mínimo, IC máximo de los parámetros hemáticos de los ratones sacrificados tanto del grupo I caso (21 ratones) como del grupo II control (5 ratones) durante el período de evaluación de toxicidad crónica (72h-12 semanas) se pueden observar en la siguiente tabla 19.

Tabla 19. Parámetros hematológicos medios ratones NOD/SCID evaluados en el período crónico.

PARAMETROS HEMATOLÓGICOS MEDIOS RATONES NOD/SCID.

	MEDIA	IC MÍNIMO	IC MÁXIMO
HB g/dl	14,5	13,1	15,8
PLAQ (x10 ⁹ /dl)	977,6	858	1097
LEUCOCITOS (x10 ⁹ /dl)	8,29	6,28	10,30
NEUTRÓFILOS (x10 ⁹ /dl)	3	2,2	3,8
LINFOCITOS (x10 ⁹ /dl)	4,3	2,8	5,8
MONOCITOS (x10 ⁹ /dl)	0,5	0,09	0,9
EOSINÓFILOS (x10 ⁹ /dl)	0,3	0,03	0,4
BASÓFILOS (x10 ⁹ /dl)	0	0	0,04

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en el nivel de hemoglobina entre los ratones NOD/SCID macho y los ratones NOD/SCID hembra. Tampoco se encontraron diferencias en el resto de parámetros hematológicos estratificados por sexo con excepción de los monocitos ($p=0,018$) Tabla 20

Tabla 20. Parámetros hematológicos medios ratones NOD/SCID evaluados en el período crónico estratificado por sexo.

PARAMETROS HEMATOLÓGICOS MEDIOS RATONES NOD/SCID MACHO Y HEMBRA.

	RATONES MACHO	RATONES HEMBRA	p
HB g/dl	14,7	14,3	0,389
PLAQ ($\times 10^9$ /dl)	970	984	0,451
LEUCOCITOS ($\times 10^9$ /dl)	8,2	8,3	0,477
NEUTRÓFILOS ($\times 10^9$ /dl)	3,1	3	0,446
LINFOCITOS ($\times 10^9$ /dl)	4,3	4,4	0,467
MONOCITOS ($\times 10^9$ /dl)	0,3	0,7	0,018
EOSINÓFILOS ($\times 10^9$ /dl)	0,3	0,3	0,353
BASÓFILOS ($\times 10^9$ /dl)	0	0	0,497

Atendiendo al tipo de tratamiento recibido (implante de modelo de constructo tipo 1 o tipo 2) no se observaron diferencias en la cifra de Hemoglobina ($p=0,222$) ni tampoco en la cifra de plaquetas entre los 2 grupos de tratamiento ($p=0,093$).

RESULTADOS

Tampoco se han objetivado diferencias significativas en el recuento absoluto de leucocitos entre los 2 grupos de tratamiento ($p=0,280$).

No se observaron diferencias en el número de neutrófilos entre las dos ramas de tratamiento ($p=0,497$).

No se observaron diferencias entre los 2 grupos con respecto al recuento absoluto de linfocitos ($p=0,275$), monocitos ($p=0,304$), eosinófilos ($p=0,457$) ni basófilos ($p=0,083$). (Tabla 21)

Tabla 21. Parámetros hematológicos medios ratones NOD/SCID evaluados en el período crónico estratificado por constructo implantado.

PARAMETROS HEMATOLÓGICOS MEDIOS RATONES NOD/SCID SEGÚN CONSTRUCTO.

	FTC+MSC+MOD	FTC+SSF 0,9%+MOD	p
HB g/dl	14,6	13,7	0,222
PLAQ ($\times 10^9$ /dl)	1012	830	0,093
LEUCOCITOS ($\times 10^9$ /dl)	8,1	9,2	0,280
NEUTRÓFILOS ($\times 10^9$ /dl)	3	3	0,497
LINFOCITOS ($\times 10^9$ /dl)	4,2	5	0,275
MONOCITOS ($\times 10^9$ /dl)	0,4	0,8	0,304
EOSINÓFILOS ($\times 10^9$ /dl)	0,3	0,3	0,457
BASÓFILOS ($\times 10^9$ /dl)	0	0	0,083

La media y el IC de los parámetros bioquímicos en suero, incluyendo función hepática y metabolismo de calcio y fósforo de los ratones sacrificados de los 2 tipos de tratamiento durante el período de evaluación de toxicidad crónica se pueden observar en la tabla 22.

Tabla 22. Parámetros bioquímicos medios ratones NOD/SCID evaluados en el período crónico.

PARAMETROS BIOQUÍMICOS MEDIOS RATONES NOD/SCID.

	MEDIA	IC MÍNIMO	IC MÁXIMO
GLUCOSA g/dl	290	264	317
UREA (x10 ⁹ /dl)	48,5	43,8	53,2
GOT (x10 ⁹ /dl)	319	222	416
GPT (x10 ⁹ /dl)	73	46	100
CALCIO (x10 ⁹ /dl)	9,3	8,7	10
FÓSFORO (x10 ⁹ /dl)	10,2	8,9	11,5
ÍNDICE HEMÓLISIS (x10 ⁹ /dl)	13,3	8	18,7
CREATININA (x10 ⁹ /dl)	0	0	0

Si estratificamos por sexo (Tabla 23) observamos diferencias estadísticamente significativas en la glucosa entre machos y hembras ($p=0,051$), urea ($p=0,029$), GOT ($p=0,036$) y GPT ($p=0,009$) . No se han observado diferencias entre machos y hembras ni en el calcio ($p=0,328$), ni en el fósforo ($p=0,422$), ni en el índice de hemólisis ($p=0,254$). La creatinina fue 0 en todos los casos por lo que no se pudo aplicar el test.

Tabla 23. Parámetros bioquímicos medios ratones NOD/SCID evaluados en el período crónico estratificado por sexo.

PARAMETROS BIOQUÍMICOS MEDIOS RATONES NOD/SCID MACHO Y HEMBRA.

	RATONES MACHO	RATONES HEMBRA	p
GLUCOSA g/dl	315	269	0,051
UREA ($\times 10^9$ /dl)	53,3	44,3	0,029
GOT ($\times 10^9$ /dl)	419	233	0,036
GPT ($\times 10^9$ /dl)	111	40	0,009
CALCIO ($\times 10^9$ /dl)	9,5	9,2	0,328
FÓSFORO ($\times 10^9$ /dl)	10,3	10,1	0,422
ÍNDICE HEMÓLISIS ($\times 10^9$ /dl)	11,3	15,1	0,254

RESULTADOS

No se han observado diferencias en ningún parámetro bioquímico entre los 2 grupos de tratamiento con respecto a los niveles en suero de glucosa ($p=0,36$), urea ($p=0,14$), GOT ($p=0,25$), GPT ($p=0,11$), calcio ($p=0,40$) ni fósforo ($p=0,24$).

La creatinina fue 0 en todos los casos por lo que no se pudo aplicar el test. (Tabla 24)

Tabla 24. Parámetros bioquímicos medios ratones NOD/SCID evaluados en el período crónico estratificado por constructo implantado.

PARAMETROS BIOQUÍMICOS MEDIOS RATONES NOD/SCID Y SEGÚN RAMA DE TRATAMIENTO.

	FTC+MSC+MOD	FTC+SSF 0,9%+MOD	p
GLUCOSA g/dl	293	280	0,359
UREA ($\times 10^9$ /dl)	46,7	56	0,144
GOT ($\times 10^9$ /dl)	303	386	0,255
GPT ($\times 10^9$ /dl)	57,6	138	0,115
CALCIO ($\times 10^9$ /dl)	9,3	9,6	0,402
FÓSFORO ($\times 10^9$ /dl)	9,8	12	0,246
ÍNDICE HEMÓLISIS ($\times 10^9$ /dl)	13,9	11,3	0,373

No observamos diferencias significativas al estratificar el índice de hemólisis de los sueros en función del constructo implantado.

Por medio del coeficiente de correlación de Pearson comprobamos que los valores de los índices de hemólisis tenían una correlación fuertemente positiva con los valores de GOT ($r=0,489$, $p=0,003$), estableciendo la siguiente ecuación de regresión: $y = 3,492 + 0,035x$ con significación estadística ($p=0,006$) .

No existió correlación entre los valores de hemólisis en los sueros y la GPT ($p=0,427$).

4.4 Examen histológico en hematoxilina-eosina.

Se ha realizado un análisis histopatológico de muestras de corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, gónadas y cerebro.

Tras su conservación en formol y fijación en parafina fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

Todos los bloques fueron analizados por el mismo observador, de forma cegada tal y como ha sido descrito en el apartado Estudios histológicos de Material y Método.

Se obtuvieron muestras para evaluación histológica del total de los órganos programados en el 100% de los ratones NOD/SCID del estudio.

Del conjunto de todas las muestras estudiadas se hallaron modificaciones histológicas en 5 de los 25 ratones NOD/SCID del grupo I caso (17,5% del total) (implantados con constructo formado por FTC+MSC +MOD), y en 1 de los 5 ratones del grupo II control (5%).

De todos los órganos estudiados, el único órgano afectado fue parénquima pulmonar y en el 100% de los casos la alteración histológica observada consistió en áreas muy localizadas de patrón intersticial.

No se han hallado diferencias estadísticamente significativas en las alteraciones histológicas entre los ratones NOD/SCID macho y los ratones NOD/SCID hembra ($p > 0,05$).

Cuando en los ratones NOD/SCID se compararon las alteraciones histológicas en función del tipo de constructo implantado, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Se reportado los siguientes hallazgos detectados en cada órgano en el apartado siguiente.

iv.1.- Corazón.

No se ha observado ninguna alteración macro ni microscópica en ninguna de los dos grupos (Figura 30).

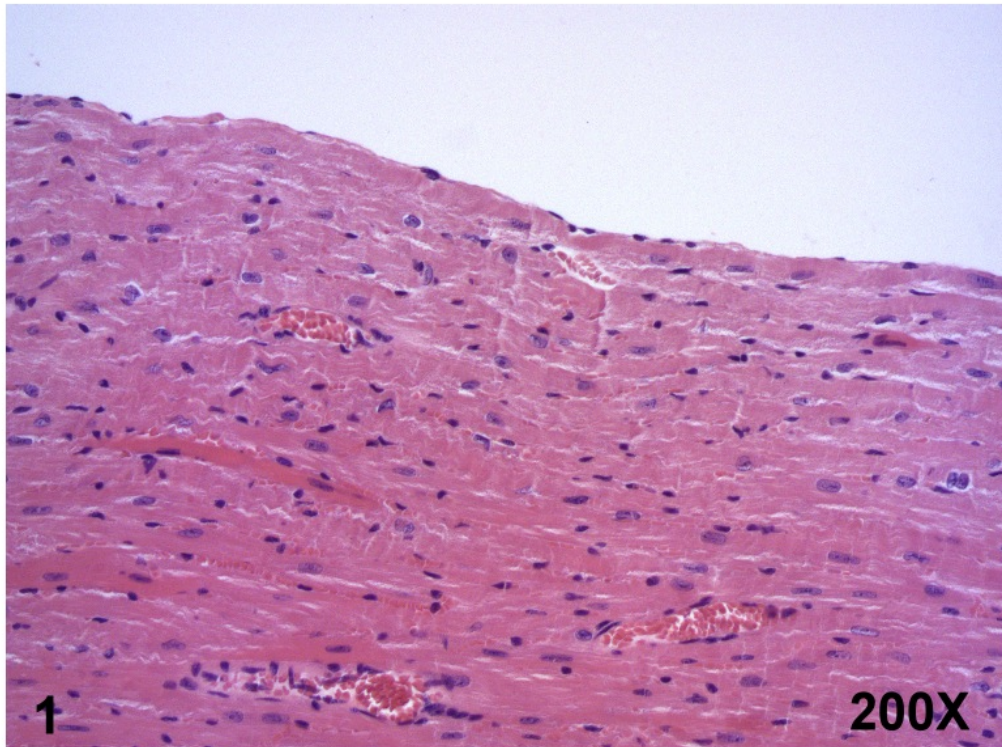


Figura 30. Imagen de microscopía óptica de sección de corazón de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).

iv.2.- Pulmón.

Se han detectado áreas localizadas de patrón intersticial en 5 de los 25 ratones NOD/SCID del grupo I y en un ratón del grupo II. (Figura 31)

En los ratones NOD/SCID estas alteraciones han sido observadas en el ratón hembra sacrificada en la 1ª semana postcirugía del grupo I, en el ratón macho sacrificado a las 2 semanas postoperatorias del grupo I, en el ratón macho sacrificado a las 5 semanas postcirugía del grupo I, en el ratón hembra de la 7ª semana del grupo I, en un ratón macho sacrificado a la 12 semana del grupo I en el y en un ratón hembra sacrificado a las 12 semanas postoperatorias del grupo II.

En el resto de animales no se observaron alteraciones morfológicas. (Figura 32)

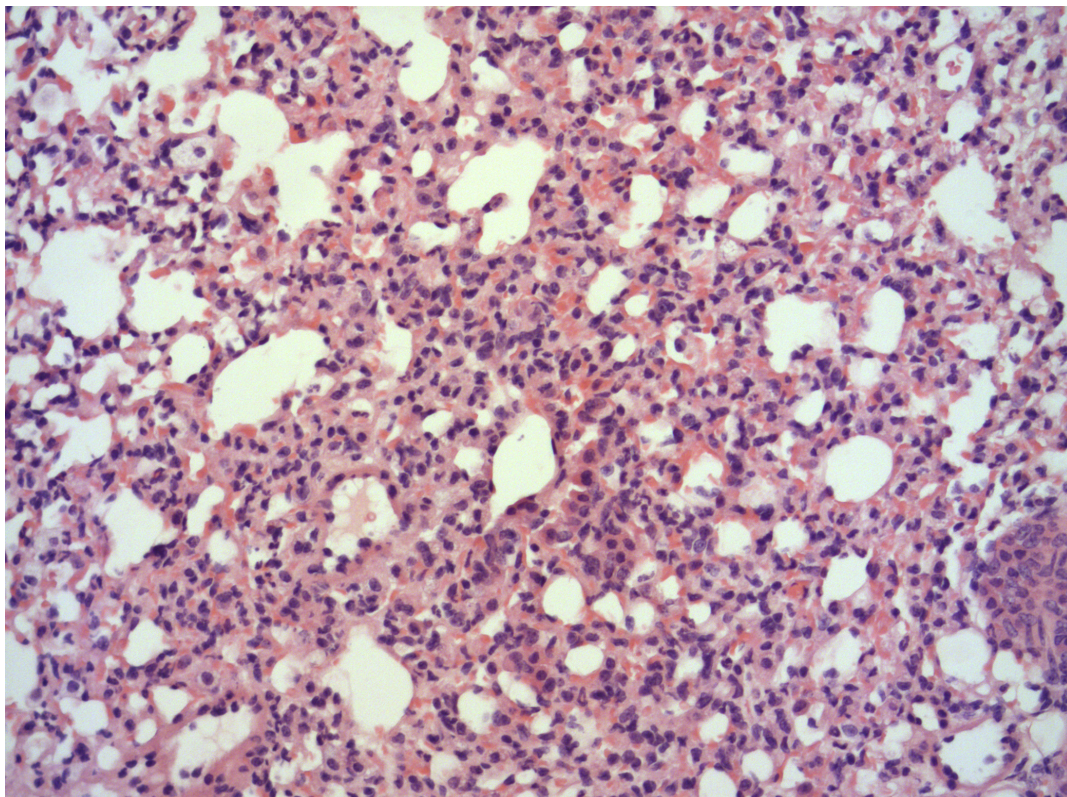


Figura 31. Imagen de microscopía óptica de sección de pulmón de ratón NOD/SCID donde se evidencia patrón intersticial (Hematoxilina-Eosina 200x).

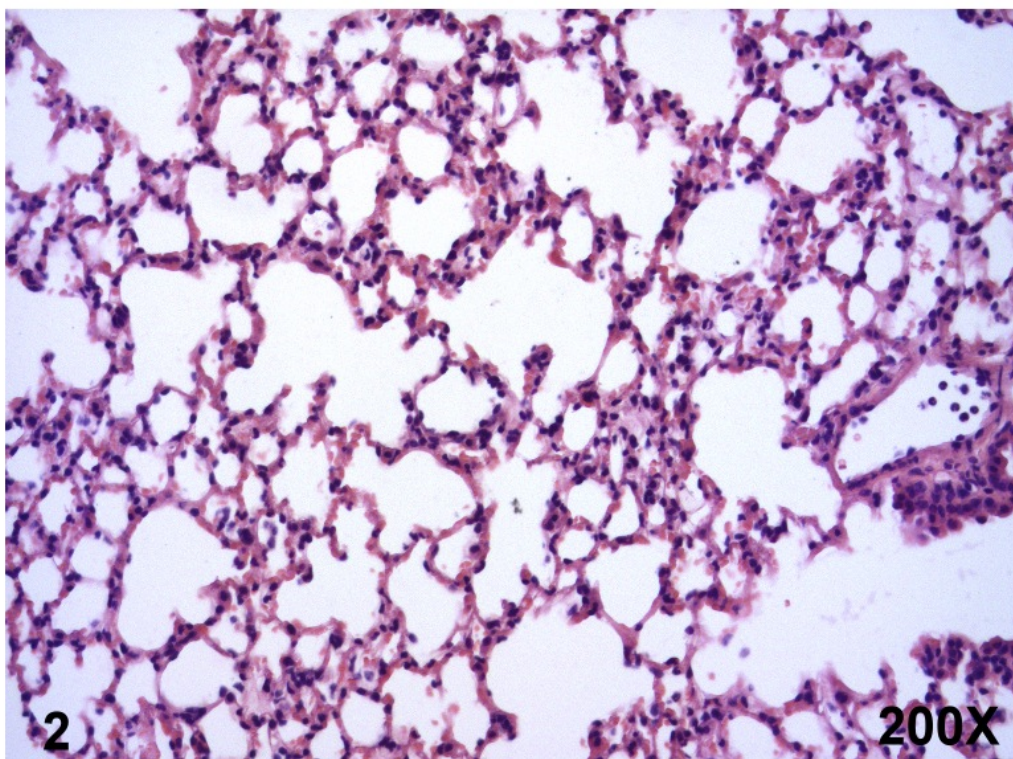


Figura 32. Imagen de microscopía óptica de sección de pulmón de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).

iv.3.- Hígado.

La arquitectura y celularidad del hígado de los ratones NOD/SCID fue normal en el 100% de los ratones (Figura 33).

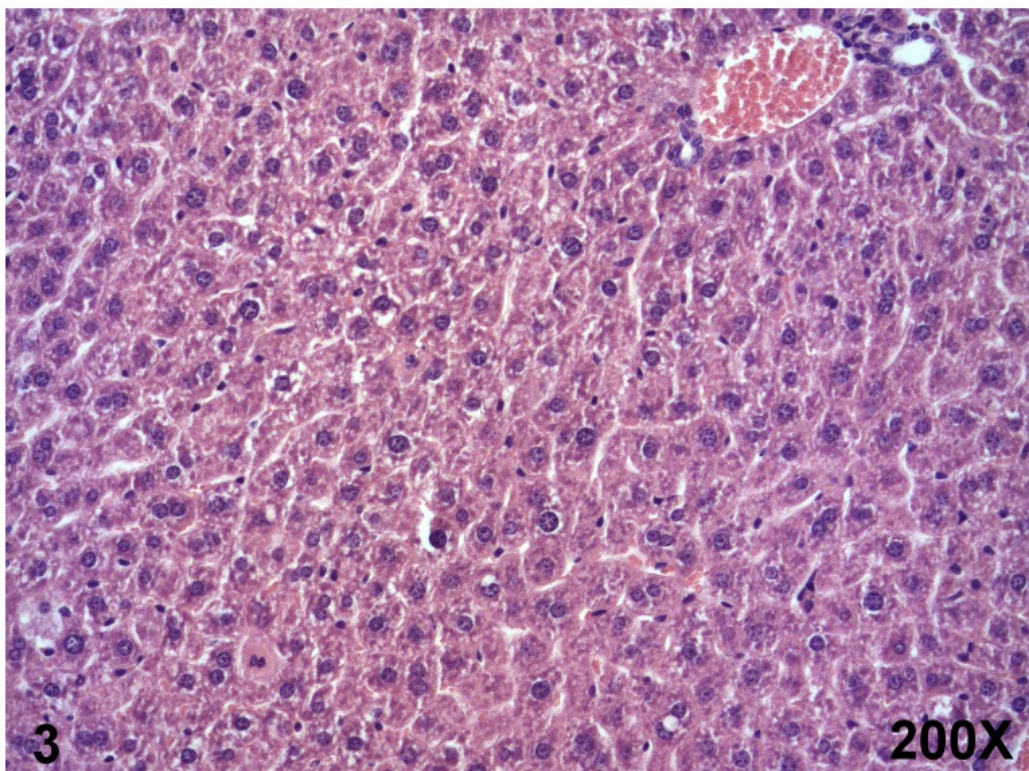


Figura 33. Imagen de microscopía óptica de sección de hígado de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).

iv.4.- Bazo

No se ha observado ninguna alteración macroscópica en ninguna de las ramas. Microscópicamente se han observado los hallazgos típicos de la cepa NOD/SCID que son la ausencia de nódulos linfáticos o poco desarrollo de los mismos. La pulpa roja ha sido normal (Figura 34).

En 1 de los 5 ratones NOD/SCID del grupo II de tratamiento que ha correspondido a un ratón macho, sacrificado a las 12 semanas se ha observado la presencia en el bazo de vainas y folículos linfoides.

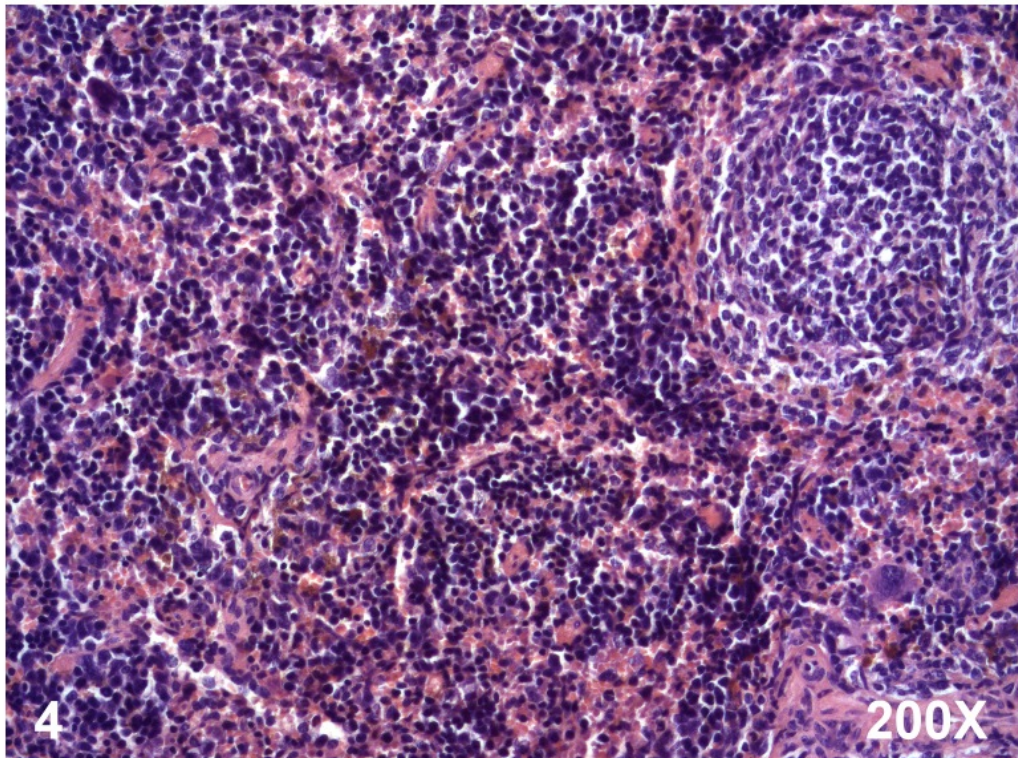


Figura 34. Imagen de microscopía óptica de sección de bazo NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).

iv.5.- Riñón.

No se ha observado ninguna alteración macro ni microscópica en ninguno de los dos grupos estudiados (Figura 35).

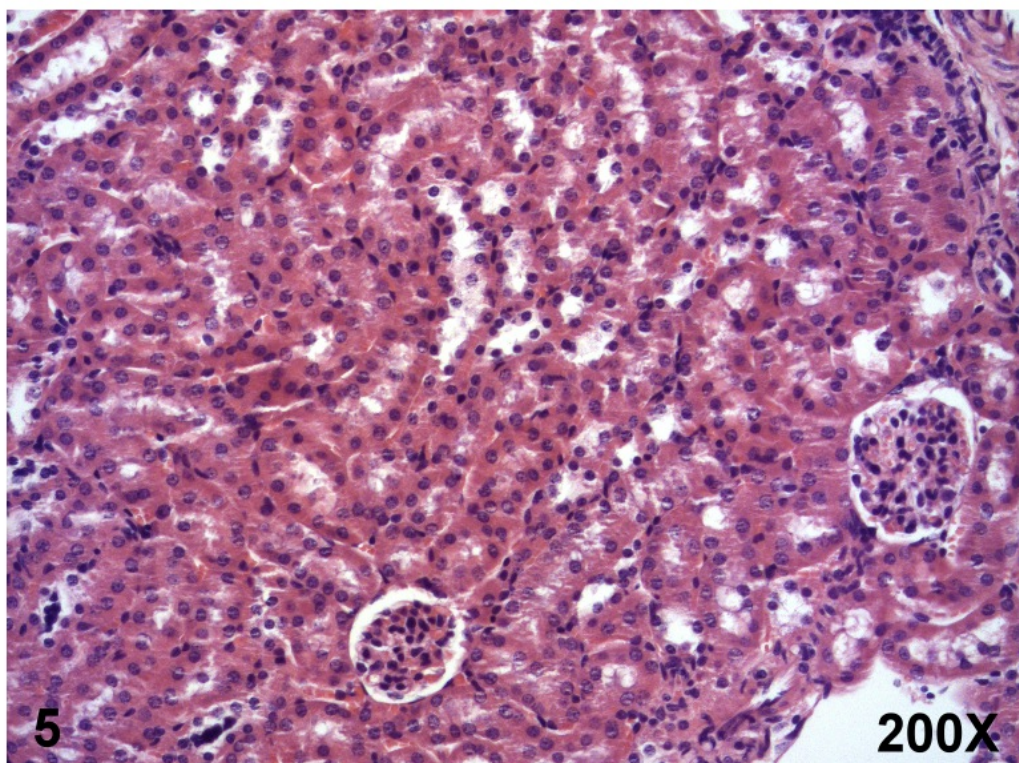


Figura 35. Imagen de microscopía óptica de sección de riñón de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).

Iv.6.- Gónadas.

No se han objetivado alteraciones ni en testículos ni en ovarios en ninguno de los dos grupos (Figura 36).

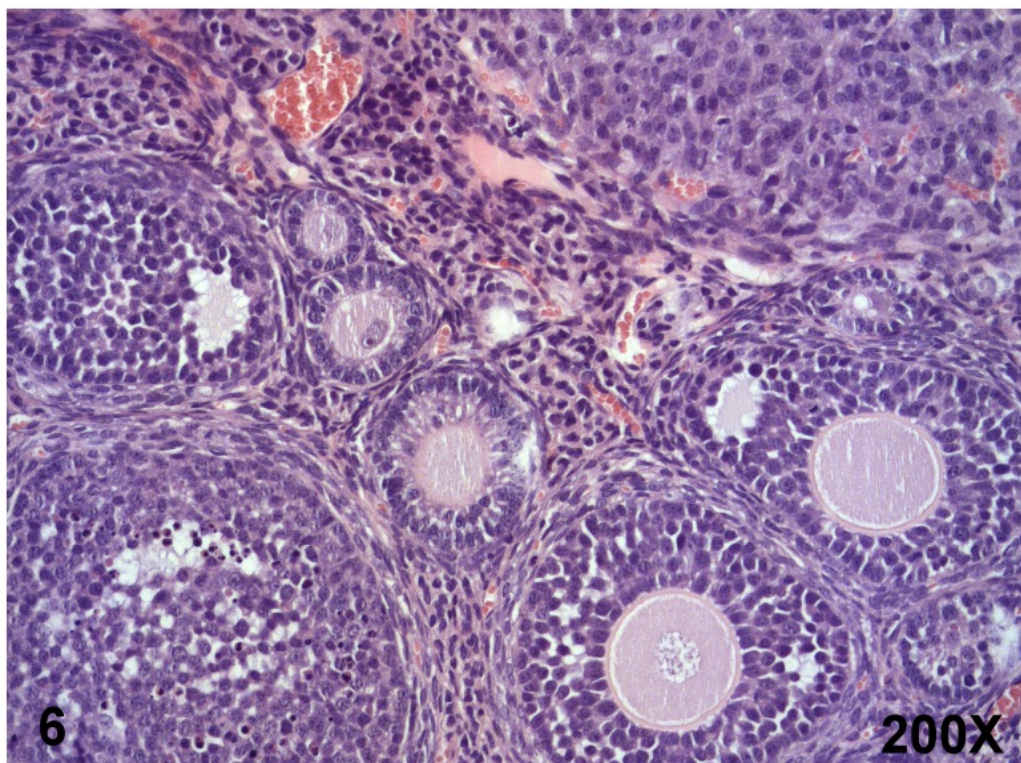


Figura 36. Imagen de microscopía óptica de sección de ovario de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).

iv.7.- Cerebro.

No se han objetivado alteraciones en ninguna de las muestras de cerebro tomadas a los ratones NOD/SCID en ninguno de los casos (Figura 37).

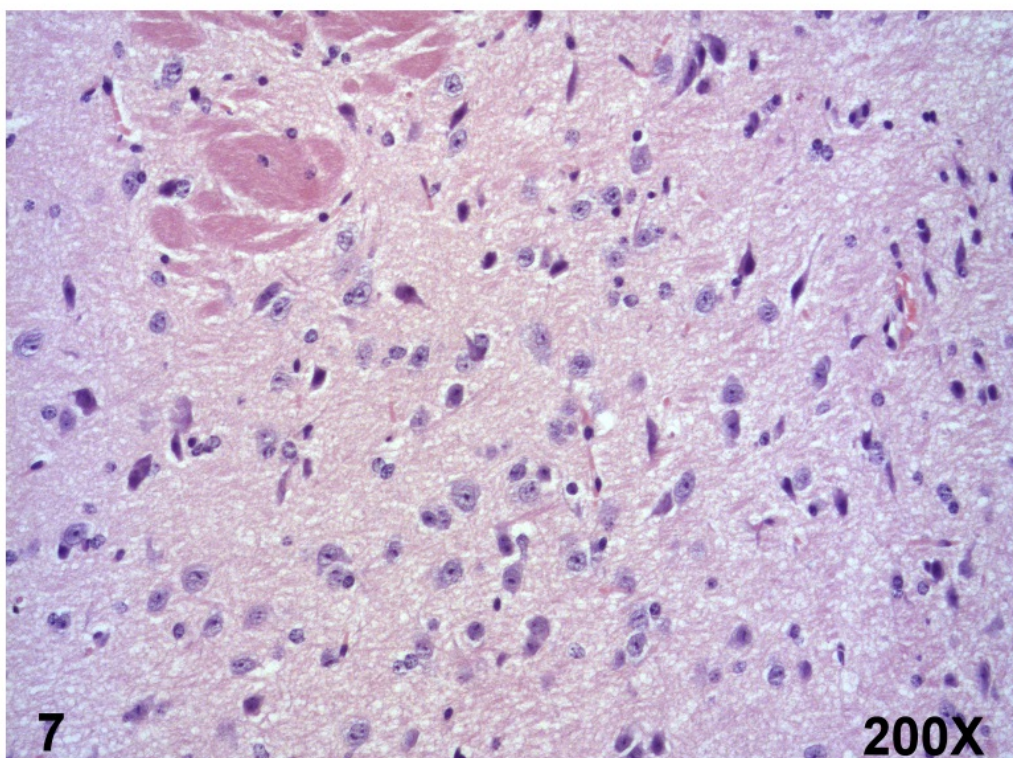


Figura 37. Imagen de microscopía óptica de sección de cerebro de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).

iv.8.- Médula ósea.

Las médula ósea obtenida de las tibias de los ratones NOD/SCID sacrificados han sido normales en los 2 grupos a estudio (Figura 38).

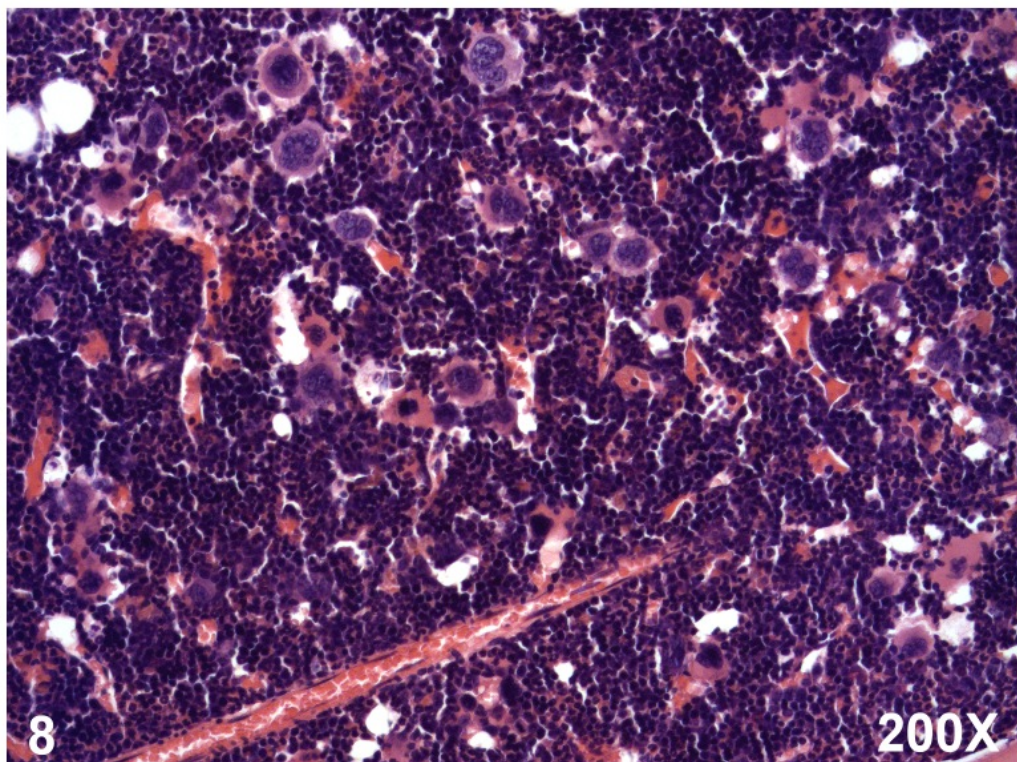


Figura 38. Imagen de microscopía óptica de sección de médula ósea de ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).

iv.9.- Hueso.

No se han objetiva alteraciones histológicas en la tibia ni en la calota de los ratones sacrificados (Figura 39).

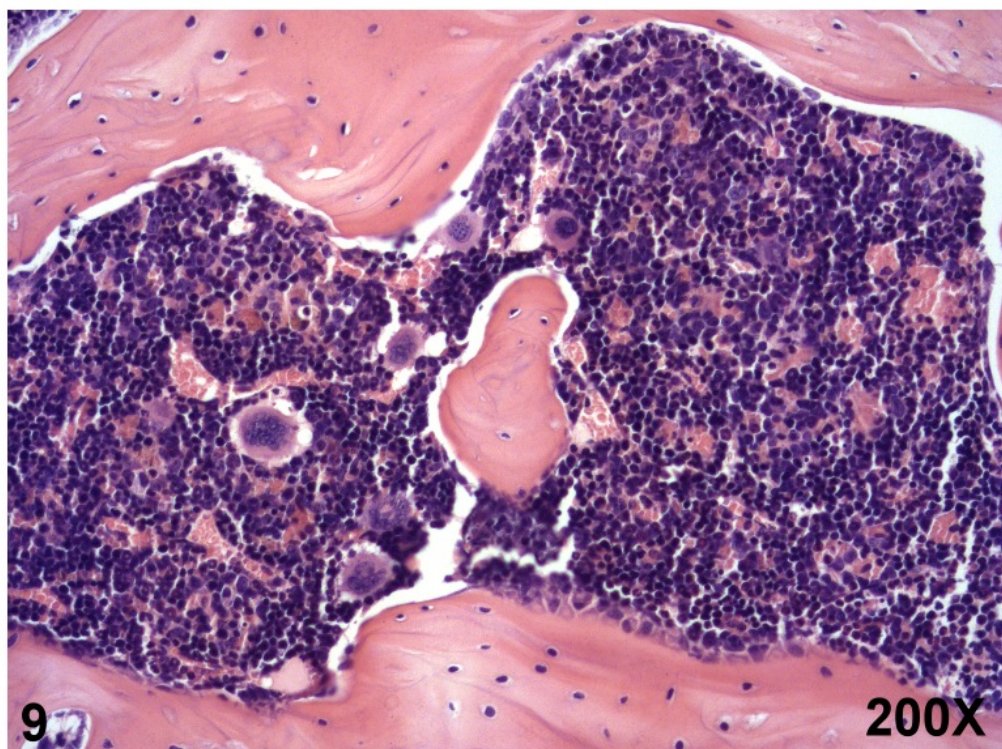


Figura 39. Imagen de microscopía óptica de sección de tejido óseo de tibia ratón NOD/SCID donde no se evidencia ningún tipo de alteraciones (Hematoxilina-Eosina 200x).

Iv.10.- Constructo.

No se han objetiva alteraciones histológicas en el constructo implantado de forma subcutánea de los ratones sacrificados. Ni el formado por MSC+FTC+MOD del grupo I. Ni tampoco en el formado por SSF 0.9% +FTC+MOD del grupo II (Figura 40).

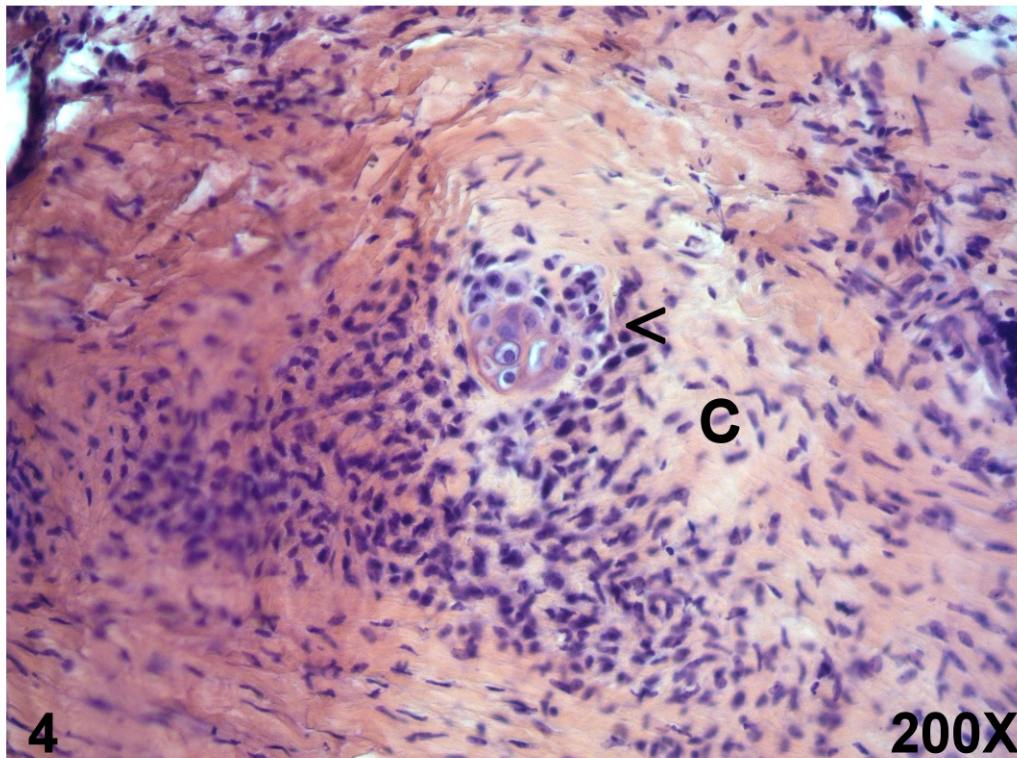


Figura 40. Imagen de sección de constructo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 200x). (C) tejido conectivo. (<) Núcleo osificación.

RESUMEN Evaluación de toxicidad crónica.

- En la evolución de las medias de peso según sexo de los ratones incluidos en la evaluación crónica de la toxicidad se han hallado diferencias significativas entre ratones macho y ratones hembra (Test T de Student) con una $p < 0,02$ desde las 72 horas postcirugía hasta la 12ª semana de evaluación.
- Cuando se valoró la media de peso en cada uno de los grupos desde las 72 horas postcirugía hasta la 12ª semana de evaluación en función del modelo de constructo implantado, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas tras aplicar la comparación de dos medias mediante la T de Student combinada previa comparación de varianzas.
- El índice de bienestar animal a las 72 horas de la cirugía, a la semana, a las 2 semanas, a las 5 semanas, a las 7 semanas, a las 9 semanas y a las 12 semanas de los ratones NOD/SCID ha sido en el 100% de los ratones de 0.
- La ganancia de peso en gramos que se ha ido produciendo por los ratones NOD/SCID del estudio en las semanas 1 postcirugía y en las semanas 2, 5, 7, 9, y 12 sigue un modelo lineal que es estadísticamente significativo con una $p=0,0001$.
- Se han objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos de los ratones NOD/SCID macho y hembra en todas las semanas, y sigue un modelo lineal que es estadísticamente significativo con una $p=0,009$.
- No han objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre los pesos de los ratones NOD/SCID del grupo I (caso, constructo tipo MSC+FTC+MOD) y los del grupo II (control, constructo tipo SSF 0,9% +FTC+MOD) en todas las semanas de evaluación $p>0,05$.

- No encontramos diferencias estadísticamente significativas en ningún parámetro hematológico entre los ratones NOD/SCID macho y los ratones hembra ($p > 0,05$), con excepción de los monocitos ($p = 0,018$).
- Se han hallado diferencias estadísticamente significativas en la glucosa entre machos y hembras ($p = 0,051$), urea ($p = 0,029$), GOT ($p = 0,036$) y GPT ($p = 0,009$).
- No se han observado diferencias entre ratones NOD/SCID macho y hembra, ni en el calcio ($p = 0,328$), en el fósforo ($p = 0,422$) o el índice de hemólisis ($p = 0,254$).
- No encontramos diferencias estadísticamente significativas en ningún parámetro hematológico ni en ningún parámetro bioquímico entre los ratones NOD/SCID del grupo I caso y del grupo II ($p > 0,05$).
- Existe una correlación entre los índices de hemólisis y los valores de GOT con un coeficiente de correlación de Pearson de $r = 0,489$, para una $p = 0,003$; estableciendo la siguiente ecuación de regresión: y (índice hemólisis) = $3,492 + 0,035x$ (GOT) con significación estadística ($p = 0,006$).
- Se ha observado algún tipo de alteración histológica en 5 de los 25 ratones NOD/SCID del grupo I caso (17,5% del total), y en 1 de los 5 ratones del grupo II control (5%), no hallándose diferencias estadísticamente significativas. En el 100% de los casos se localizó en parénquima pulmonar y consistió en áreas muy localizadas de patrón intersticial pulmonar.

5. Ensayos de biodistribución.

5.1 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por retrotranscripción (PCR-RT).

Para comprobar la presencia o no de células humanas en los distintos órganos de cada ratón se realizó el análisis de la presencia de Actina y β 2microglobulina murina y humana siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de Material y Método.

Se ha realizado un total de 720 PCR-RT para la Actina y 720 PCR-RT para la β 2microglobulina.

El análisis PCR-RT de todas las muestras murinas correspondientes a la Actina se muestran en la tabla 25. En esta se describe la media y la desviación estándar para cada órgano de ratón que ha sido analizado en 3 ocasiones. Donde se comprueba que los tejidos analizados corresponden a tejido murino y la sonda control humana es negativa.

Las medias, desviaciones estándar e intervalo de confianza para todas las muestras se pueden observar en la tabla 26.

RESULTADOS

Tabla 25. PCR-RT para Actina murina ratones NOD/SCID.

ID	Corazón	DE	Pulmón	DE	Hígado	DE	Bazo	DE	Riñón	DE	Gónada	DE	Cerebro	DE	Sangre P.	DE
1	24,12	0,11	29,01	0,08	27,29	0,13	30,11	0,06	25,35	0,11	22,78	0,06	23,74	0,05	26,87	0,08
2	23,96	0,02	28,35	0,06	25,99	0,06	29,86	0,13	26,57	0,09	26,62	3,21	23,76	0,09	27,4	0,14
3	28,27	0,1	29,02	0,13	27,33	0,03	31,34	0,13	28,57	0,18	24,57	0,08	24,4	0,16	25,5	0,08
4	28,34	0,29	29,81	0,2	25,95	0,29	32,01	0,05	28,01	0,21	23,84	0,05	26,1	0,14	26,71	0,02
5	27,57	0,33	28,7	0,04	28,33	0,24	31,45	0,26	26,67	0,08	24,07	0,23	24,49	0,23	26,55	0,14
6	28,37	0,14	29,02	0,13	28,68	0,15	29,79	0,08	27,21	0,06	23,48	0,08	24,21	0,22	25,99	0,13
7	24,21	0,05	28,19	0,09	25,65	0,08	30,6	0,2	24,76	0,08	24,76	0,08	26,27	0,1	27,69	0,09
8	23,72	0,12	28,37	0,08	25,75	0,17	31,14	0,1	24,58	0,12	24,46	0,08	23,43	0,17	27,47	0,16
9	27,48	0,17	29,85	0,07	26,34	0,19	31,39	0,23	26,75	0,2	24,15	0,11	23,95	0,16	27,88	0,05
10	27,03	0,14	29	0,17	26,41	0,45	31,69	0,21	27,11	0,14	25,32	0,1	24,21	0,08	26,68	0,06
11	24,16	0,09	28,18	0,09	25,74	0,02	29,53	0,21	24,05	0,09	22,76	0,14	24,06	0,14	25,03	0,03
12	25,33	0,07	28,36	0,04	27,45	0,06	30,25	0,04	24,35	0,08	23,64	0,13	23,64	0,1	23,93	0,08
13	26,87	0,06	28,8	0,14	28,92	0,09	30,8	0,02	26,19	0,19	24,69	0,05	29,23	0,11	25,24	0,09
14	28,57	0,3	30,62	0,06	29,14	0,07	33,66	0,08	26,8	0,06	25,52	0,16	26,05	0,04	29,57	0,07
15	24,43	0,12	27,65	0,13	26,08	0,07	29,48	0,32	23,84	0,04	29,22	0,08	22,93	0,11	26,15	0,05
16	24,58	0,01	27,68	0,14	26,08	0,16	29,86	0,09	24,6	0,11	23,35	0,07	22,46	0,09	29,42	0,03
17	28,07	0,16	29,42	0,19	28,57	0,04	33,39	0,18	31,18	0,23	21,9	0,02	23,69	0,09	30,07	0,14
18	27,38	0,07	27,92	0,1	26,25	0,07	32,66	0,2	25,3	0,07	23,28	0,14	25,09	0,07	23,84	0,18
19	27,63	0,36	29,18	0,09	28,3	0,07	30,24	0,12	26,44	0,09	29,07	0,13	23,17	0,03	26,04	0,27
20	26,28	0,22	26,95	0,08	26,69	0,12	31,28	0,07	25,36	0,17	23,17	0,19	23,58	0,15	26,78	0,16
21	27,57	0,09	30,1	0,07	25,92	0,06	32,27	0,23	26,15	0,25	22,36	0,11	23,16	0,19	28,53	0,08
22	26,74	0,13	27,95	0,16	26,54	0,13	31,53	0,04	26,42	0,19	22,9	0,09	23,15	0,22	25,86	0,03
23	28,92	0,18	29,71	0,14	27,78	0,04	32,8	0,24	30,84	0,27	21,73	0,07	23,3	0,22	31,83	0,23
24	28,09	0,09	30,47	0,15	27,12	0,05	31,8	0,08	26,96	0,13	22,94	0,1	24,38	0,07	29,33	0,18
25	28,33	0,17	30	0,05	27,51	0,03	31,62	0,2	26,73	0,1	23,89	0,06	23,82	0,09	31,08	0,11
26	23,87	0,05	28,28	0,13	26,3	0,12	30,71	0,08	24,69	0,09	23,47	0,11	24	0,07	27,24	0,04
27	24,17	0,1	29,08	0,15	25,88	0,07	30,04	0,09	25,73	0,06	25,73	0,06	25,94	0,16	26,05	0,18
28	28,07	0,14	30,19	0,11	26,18	0,15	32,16	0,11	27,03	0,12	24,3	0,06	28,95	0,22	27,2	0,12
29	27,78	0,47	30,55	0,13	26,64	0,15	31,81	0,39	27,39	0,11	24,64	0,17	28,09	0,14	25,78	0,17
30	27,22	0,11	28,42	0,17	24,26	0,03	32,84	0,58	26,45	0,16	22,81	0,12	22,67	0,07	28,37	0,22
DNA HUM ***	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

RESULTADOS

Tabla 25. PCR-RT para Actina murina ratones NOD/SCID.

ID	Corazón	DE	Pulmón	DE	Hígado	DE	Bazo	DE	Riñón	DE	Gónada	DE	Cerebro	DE	Sangre P.	DE
DNA RATO ..	26,96	0,13	27,34	0,16	25,47	0,07	26,49	0,17	25,34	0,06	25,47	0,24	26,09	0,07	31,26	0,09

Tabla 26. Amplificación PCR-RT para Actina murina ratones NOD/SCID.

Número de copias amplificadas			
	Media	Desviación Estándar	Intervalo Confianza
Corazón	26,6	0,1	26,5 - 26,6
Pulmón	29	0,1	28,9 - 29
Hígado	26,8	0,1	26,8 - 26,9
Bazo	31,3	0,2	31,2 - 31,3
Riñón	26,4	0,1	26,4 - 26,5
Gónada	24,2	0,2	24,1 - 24,3
Cerebro	24,5	0,1	24,5 - 24,6
Sangre Periférica	27,2	0,1	27,2 - 27,2

Si hacemos diferenciación por sexo o por constructo, no se observan diferencias estadísticamente significativas en ningún caso (Tabla 27, 28).

RESULTADOS

Tabla 27. Amplificación PCR-RT para Actina murina ratones NOD/SCID estratificado por sexo.

Numero de copias amplificadas			
	Media Ratones NOD/SCID macho	Media Ratones NOD/SCID hembra	p
Corazón	26,2	26,9	0,26
Pulmón	28,6	29,2	0,07
Hígado	26,8	26,9	0,92
Bazo	31,1	31,4	0,52
Riñón	25,9	26,8	0,17
Gónada	23,7	24,6	0,20
Cerebro	24,6	24,5	0,85
Sangre Periférica	26,5	27,8	0,08

Tabla 28. Amplificación PCR-RT para Actina murina ratones NOD/SCID estratificado por rama de tratamiento.

Numero de copias amplificadas			
	Media Ratones NOD/SCID constructo tipo 1 (FTC+MSC +MOD)	Media Ratones NOD/SCID constructo tipo 2 (FTC+SSF 0,9%+MOD)	p
Corazón	26,6	26,2	0,64
Pulmón	28,9	29,3	0,39
Hígado	27	25,9	0,36
Bazo	31,2	31,5	,0,62
Riñón	26,4	26,3	0,84
Gónada	24,2	24,2	0,99
Cerebro	24,3	25,9	0,47
Sangre Periférica	27,3	26,9	0,73

Se ha realizado el mismo análisis PCR-RT para la β 2microglobulina murina. La tabla 29 muestra las medias y las desviaciones estándar de las 3 muestras de cada órgano obtenidas por cada ratón NOD/SCID analizado. Donde se comprueba que los tejidos analizados corresponden a tejido murino y la sonda control humana es negativa.

RESULTADOS

Tabla 29. PCR-RT para $\beta 2$ microglobulina murina ratones NOD/SCID.

ID	Corazón	DE	Pulmón	DE	Hígado	DE	Bazo	DE	Riñón	DE	Gónada	DE	Cerebro	DE	Sangre P.	DE
1	26,21	0,10	30,23	0,09	24,53	0,21	33,71	0,88	26,73	0,04	26,58	0,14	27,76	0,22	27,48	0,09
2	25,21	0,09	28,53	0,06	23,60	0,08	32,56	0,02	25,60	0,07	24,59	0,05	27,49	0,11	26,5	0,17
3	29,02	0,7	30,1	0,18	24,71	0,20	33,96	0,83	28,57	0,18	24,57	0,08	24,4	0,16	27,2	0,09
4	28,93	1,02	32,11	0,21	24,58	0,04	34,99	0,63	27,68	0,07	24,72	0,08	26,1	0,14	28,21	0,13
5	27,30	0,02	31,4	0,05	26,66	0,17	33,72	0,06	28,91	0,1	27,59	0,02	28,12	0,07	27,78	0,07
6	28,13	0,36	30,6	0,09	25,58	0,21	34,16	0,39	28,7	0,09	24,16	0,08	27,58	0,07	27,33	0,15
7	25,19	0,02	29,32	0,05	23,28	0,14	33,6	0,5	25,53	0,04	25,33	0,07	26,27	0,1	29,58	0,20
8	25,57	0,03	28,93	0,18	23,41	0,07	33,27	0,2	24,59	0,12	26,10	0,06	27,4	0,06	26,91	0,14
9	25,46	0,20	30,82	0,06	24,95	0,07	36,47	1,82	26,23	0,1	24,15	0,11	27,36	0,11	27,09	0,2
10	26,10	0,30	31,43	0,13	25,61	0,05	35,33	1,31	26,84	0,07	25,32	0,1	27,64	0,06	29,16	0,18
11	25,43	0,18	28,40	0,09	23,07	0,03	32,87	0,86	23,66	0,03	26,37	0,17	26,5	0,07	26,91	0,14
12	25,58	0,15	29,60	0,07	23,68	0,04	32,88	0,12	24,78	0,13	25,06	0,16	31,56	0,13	25,55	0,12
13	26,62	0,1	31,42	0,3	26,25	0,02	31,48	0,14	25,91	0,11	28,72	0,13	32,69	0,38	26,73	0,04
14	26,15	0,07	30,4	0,08	24,54	0,12	34,63	0,28	25,98	0,14	25,58	0,22	28,09	0,1	29,98	0,03
15	26,44	0,09	28,60	0,05	23,08	0,15	32,61	0,07	24,39	0,15	31,32	0,15	27,34	0,09	27,97	0,04
16	25,78	0,12	29,13	0,23	23,87	0,13	32,76	0,19	25,5	0,10	27,02	0,08	27,38	0,13	30,04	0,14
17	27,15	0,19	31,75	0,23	26,55	0,09	32,11	0,11	31,96	0,27	24,34	0,08	27,27	0,18	30,04	0,27
18	26,79	0,04	32,27	0,06	24,86	0,18	31,9	0,14	26,3	0,1	27,37	0,09	28,94	0,1	26,31	0,26
19	26,58	0,16	32,03	0,53	27,08	0,07	31,72	0,05	25,82	0,18	31,3	0,1	27,42	0,14	26,91	0,12
20	26,14	0,06	30,62	0,15	26,4	0,11	31,22	0,22	26,79	0,08	27,42	0,24	27,17	0,09	29,02	0,19
21	26,59	0,05	31,7	0,64	23,51	0,22	31,4	0,22	26,69	0,16	24,94	0,09	26,4	0,02	28,5	0,08
22	27,23	0,02	30,56	0,08	26,43	0,07	31,63	0,12	26,47	0,09	26,38	0,1	27,75	0,14	27,43	0,05
23	27,83	0,07	32,71	0,11	25,32	0,13	31,73	0,1	32,08	0,06	24,49	0,15	27,23	0,06	31,74	0,11
24	28,31	0,05	32,75	0,02	25,46	0,17	31,99	0,24	27,42	0,15	25,11	0,13	28,13	0,13	29,77	0,19
25	27,11	0,23	29,02	0,03	26,4	0,15	31,61	0,13	27,88	0,1	27,49	0,07	27,47	0,08	31,54	0,07
26	26,45	0,18	29,43	0,01	24,2	0,18	33,29	0,44	25,78	0,10	27,21	0,14	27,9	0,07	29,33	0,09
27	24,73	0,2	30,20	0,00	23,63	0,11	34,65	1,53	26,74	0,06	27,04	0,03	25,94	0,16	26,05	0,18
28	26,82	0,16	32,14	0,12	25,31	0,20	32,23	0,38	27,03	0,12	24,3	0,06	25,25	0,18	26,81	0,09
29	26,29	0,18	31,87	0,08	25,56	0,23	33,35	0,33	27,04	0,20	24,64	0,17	28,23	0,13	24,76	0,09
30	26,69	0,1	34,17	1,06	22,54	0,16	31,87	0,13	27,31	0,08	25,02	0,13	27,12	0,17	29,95	0,1
DNA HUM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 29. PCR-RT para $\beta 2$ microglobulina murina ratones NOD/SCID.

ID	Corazón	DE	Pulmón	DE	Hígado	DE	Bazo	DE	Riñón	DE	Gónada	DE	Cerebro	DE	Sangre P.	DE
DNA RATÓ	26,49	0,16	27,16	0,05	26,37	0,15	24,83	0,16	25,87	0,13	25,77	0,06	25,69	0,06	25,27	0,15

Las medias, desviaciones estándar e intervalo de confianza para todas las muestras se pueden observar en la tabla 30.

Tabla 30. Amplificación PCR-RT para $\beta 2$ microglobulina murina ratones NOD/SCID.

Numero de copias amplificadas			
	Media	Desviación Estándar	Intervalo Confianza
Corazón	26,6	0,2	26,5 - 26,7
Pulmón	30,7	0,2	30,7 - 30,8
Hígado	24,8	0,1	24,8 - 24,9
Bazo	33	0,4	32,8 - 33,2
Riñón	26,8	0,1	26,8 - 26,9
Gónada	26,1	0,1	26,1 - 26,2
Cerebro	27,5	0,1	27,5 - 27,6
Sangre Periférica	28,1	0,1	28 - 28,1

Si hacemos diferenciación por sexo o por constructo, no se observan diferencias estadísticamente significativas en ningún caso (Tabla 31, 32).

RESULTADOS

Tabla 31. Amplificación PCR-RT para β 2microglobulina murina ratones NOD/SCID estratificado por sexo.

Numero de copias amplificadas			
	Media Ratones NOD/SCID macho	Media Ratones NOD/SCID hembra	p
Corazón	26,7	26,5	0,76
Pulmón	30,6	30,9	0,66
Hígado	25,1	24,6	0,32
Bazo	32,9	33,1	0,71
Riñón	26,5	27,2	0,21
Gónada	26,5	25,9	0,10
Cerebro	27,9	27,2	0,70
Sangre Periférica	27,8	28,4	0,25

Tabla 32. Amplificación PCR-RT para β 2microglobulina murina ratones NOD/SCID estratificado por grupo de tratamiento.

Numero de copias amplificadas			
	Media Ratones NOD/SCID constructo tipo 1 (FTC+MSC +MOD)	Media Ratones NOD/SCID constructo tipo 2 (FTC+SSF 0,9%+MOD)	p
Corazón	26,7	26,2	0,38
Pulmón	30,6	31,6	0,17
Hígado	24,9	24,2	0,28
Bazo	33	33,1	0,88
Riñón	26,8	26,8	0,94
Gónada	26,2	25,6	0,53
Cerebro	27,7	26,9	0,32
Sangre Periférica	28,2	27,4	0,33

Test de detección PCR-RT humanas.

Los resultados de la aplicación de la PCR-RT a las muestras obtenidas de distintas localizaciones, tanto para Actina como para β 2microglobulina humanas han sido negativas en el 100% los casos. Con esto comprobamos la ausencia de tejido de origen humano en las distintas muestras obtenidas de los ratones siendo la sonda control humana amplificada. (Tabla 33, 34).

RESULTADOS

Tabla 33. PCR-RT para Actina humana ratones NOD/SCID.

ID	Corazón	DE	Pulmón	DE	Hígado	DE	Bazo	DE	Riñón	DE	Gónada	DE	Cerebro	DE	Sangre P.	DE
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DNA HUM	24,91	0,12	24,79	0,06	24,17	0,15	25,08	0,09	23,98	0,04	26,66	0,09	26,70	0,06	25,93	0,23

Tabla 33. PCR-RT para Actina humana ratones NOD/SCID.

ID	Corazón	DE	Pulmón	DE	Hígado	DE	Bazo	DE	Riñón	DE	Gónada	DE	Cerebro	DE	Sangre P.	DE
DNA RATÓ	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0

RESULTADOS

Tabla 34. PCR-RT para $\beta 2$ microglobulina humana ratones NOD/SCID.

ID	Corazón	DE	Pulmón	DE	Hígado	DE	Bazo	DE	Riñón	DE	Gónada	DE	Cerebro	DE	Sangre P.	DE
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DNA HUM	25,04	0,09	26,40	0,14	24,76	0,14	25,54	0,11	25,05	0,77	26,70	0,1	26,66	0,09	24,71	0,13

Tabla 34. PCR-RT para β 2microglobulina humana ratones NOD/SCID.

ID	Corazón	DE	Pulmón	DE	Hígado	DE	Bazo	DE	Riñón	DE	Gónada	DE	Cerebro	DE	Sangre P.	DE
DNA RATÓ	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0

RESUMEN. Ensayos de biodistribución.

- Los resultados de las PCR-RT de todas las muestras analizadas de ratón, tanto para Actina como para $\beta 2$ microglobulina murinas han sido positivas y homogéneas en el 100% los casos.
- Los resultados de las PCR-RT de todas las muestras analizadas de ratón, tanto para Actina como para $\beta 2$ microglobulina humanas han sido negativas en el 100% los casos.
- Si hacemos en las medias de amplificación de las PCR-RT murinas diferenciación por sexo o por constructo, no se observan diferencias estadísticamente significativas en ningún caso ($p>0,05$).

6. Análisis de eficacia del implante del constructo.

6.1 Estudios histológicos hematoxilina-eosina.

Se ha realizado estudio histológico mediante tinción de hematoxilina-eosina del constructo implantado tanto de forma subcutánea como de forma intramuscular a los 30 ratones NOD/SCID (Figuras 41-44).

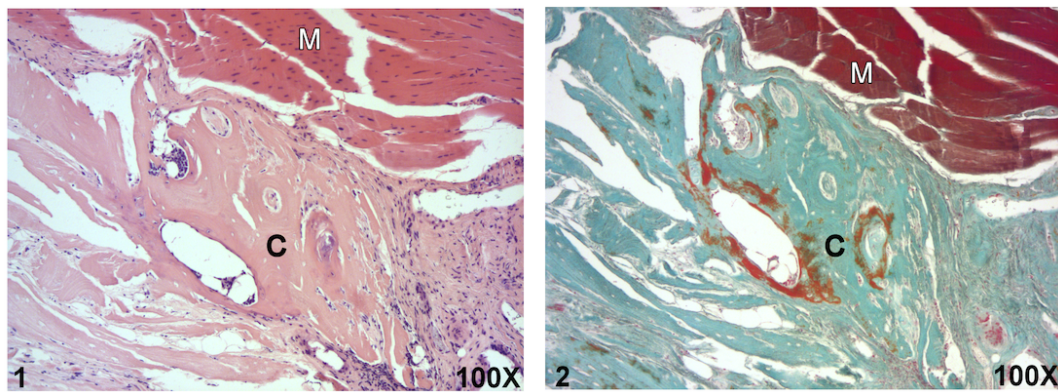


Figura 41. 1 Imagen de sección de constructo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 100x). 2 Imagen de sección de constructo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Tricrómico Masson 100x)(C) tejido conectivo de hueso neoformado. (M) Músculo.

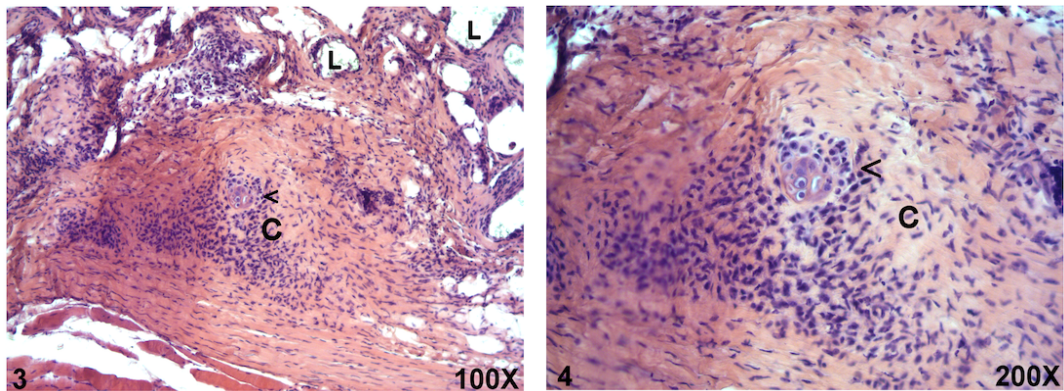


Figura 42. 3 Imagen de sección de constructo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 100x). 4 Imagen de sección de constructo subcutáneo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 200x) (C) tejido conectivo. (<) Núcleo osificación. (L) zona de linfangiectasia.

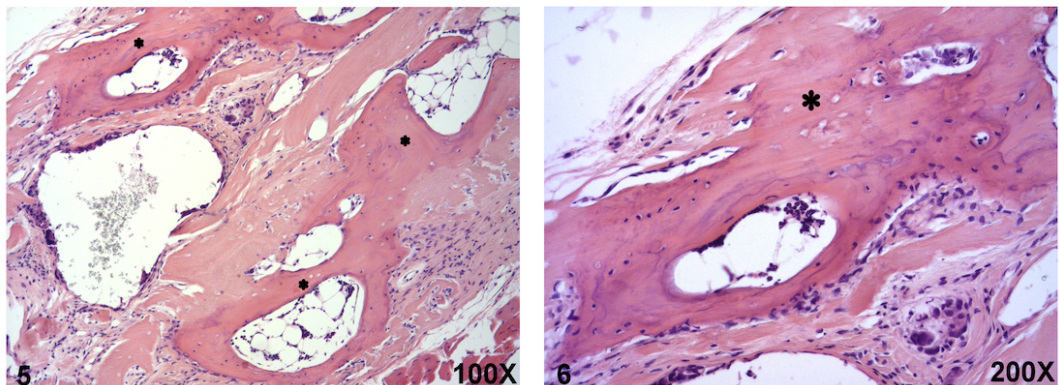


Figura 43. 5 Imagen de sección de constructo subcutáneo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 100x). 6 Imagen de sección de constructo subcutáneo FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 200x)(*) tejido de hueso neoformado.

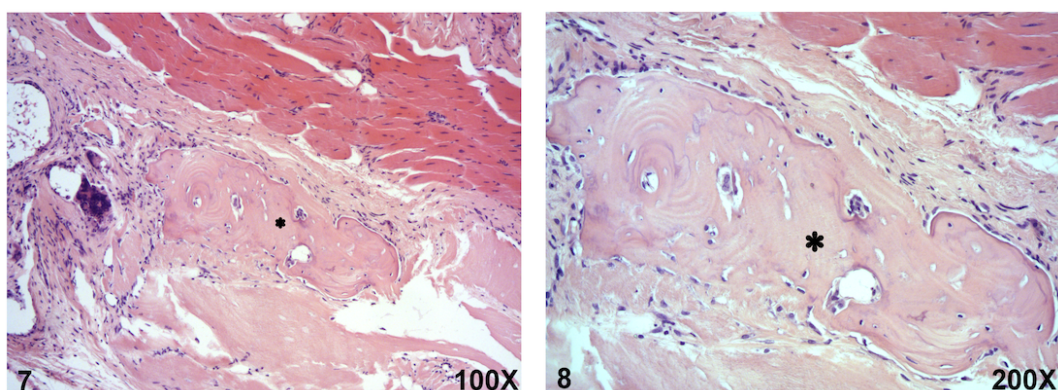


Figura 44. 7 Imagen de sección de constructo intramuscular FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 100x). 8 Imagen de sección de constructo intramuscular FTC+MSC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso (Hematoxilina-Eosina 200x)() tejido de hueso neoformado.*

A continuación se muestra una tabla con los hallazgos más significantes (Tabla 35).

Tabla 35. Hallazgos histológicos relevantes en el modelo de constructo implantado de todos los ratones.

ID ratón	Constructo implantado de forma Subcutánea	Constructo implantado de forma Intramuscular
1	2	2
2	2	2
3	2	5
4	7	6
5	5	0
6	5	2
7	7	6
8	1	1
9	6	5
10	6	9
11	7	1
12	8	8
13	6	8
14	4	8
15	7	6
16	10	10
17	7	8
18	7	1
19	9	1
20	9	4
21	7	9
22	5	5
23	7	7
24	10	1
25	9	2
26	7	3

- 0= No Valorable.
- 1= Material cristaloides
- 2= Material cristaloides asociado a infiltrado inflamatorio
- 3= Material cristaloides asociado a zona de proliferación conectiva
- 4= 2 y 3
- 5= Material denso acidófilo y homogéneo similar a tejido óseo laminar.
- 6= Material similar a tejido óseo laminar asociado zonas de proliferación conectiva.
- 7= Material similar a tejido óseo laminar asociado zonas de organización.
- 8= 6 y 7.
- 9= Diferenciación cartilaginosa
- 10 = Tejido óseo laminar

27	6	8
28	1	2
29	7	2
30	2	2

Con el objeto de obtener una aproximación a la valoración de la eficacia del modelo de constructo implantado, se ha considerado categorizar agrupando los resultados anteriores en 3 estadios, siendo 0 (valor 0) no valorable, 1 no se observa que exista neoformación ósea (valores 1-8) y 2 en los que se pone de manifiesto la neoformación ósea por la observación de diferenciación cartilaginosa o la visualización de tejido óseo laminar (valores 9 y 10). Basándonos en esto, en las siguientes tabla se observa la evolución según semanas en los diferentes grupos de tratamiento (Tabla 36, 37, 38 y 39).

De forma gráfica, es posible observar la evolución cronológica de la formación ósea en los dos tipos de implante (subcutáneo e intramuscular) en los ratones del grupo I (Figuras 45 y 46).

Tabla 36. N° ratones NOD/SCID (constructo tipo 1) en los que se ha evaluado la formación ósea subcutánea según periodo de sacrificio

	0	1	2
24H n=25	0	2	0
48H n=23	0	2	0
1 SEMANA n=21	0	2	0
2 SEMANAS n=21	0	1	1
5 SEMANAS n=19	0	2	0
7 SEMANAS n=15	0	1	1
9 SEMANAS n=13	0	1	1
12 SEMANAS n=11	0	4	7
Total	0	15	10

Tabla 37. N° ratones NOD/SCID (constructo tipo 1) en los que se ha evaluado la formación ósea intramuscular según periodo de sacrificio.

	0	1	2
24H n=25	2	0	0
48H n=23	2	0	0
1 SEMANA n=21	2	0	0
2 SEMANAS n=21	2	0	0
5 SEMANAS n=19	2	0	0
7 SEMANAS n=15	2	0	0
9 SEMANAS n=13	0	1	1
12 SEMANAS n=11	4	1	6
Total	16	2	7

Tabla 38. N° ratones NOD/SCID (constructo tipo 2) en los que se ha evaluado la formación ósea subcutánea según periodo de sacrificio.

	0	1	2
12 SEMANAS n=5	0	5	0
Total	0	5	0

Tabla 39. N° ratones NOD/SCID (constructo tipo 2) en los que se ha evaluado la formación ósea intramuscular según periodo de sacrificio.

	0	1	2
12 SEMANAS n=5	0	5	0
Total	0	5	0

Evolución Formación Ósea Subcutáneo Casos (modelo de constructo tipo 1)

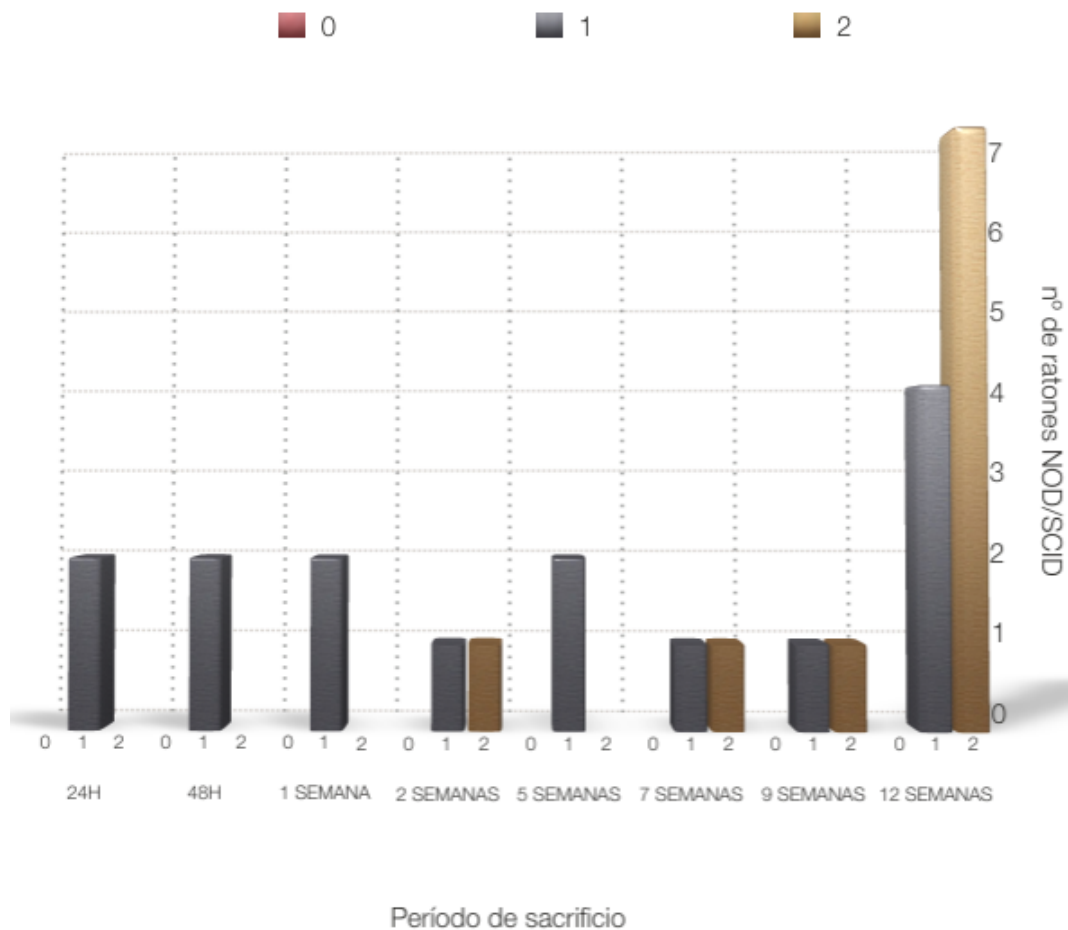


Figura 45. Evolución formación ósea ratones NOD/SCID de implante subcutáneo de los casos (modelo de constructo tipo 1)

Evolución formación ósea intramuscular casos (modelo de constructo tipo 1)

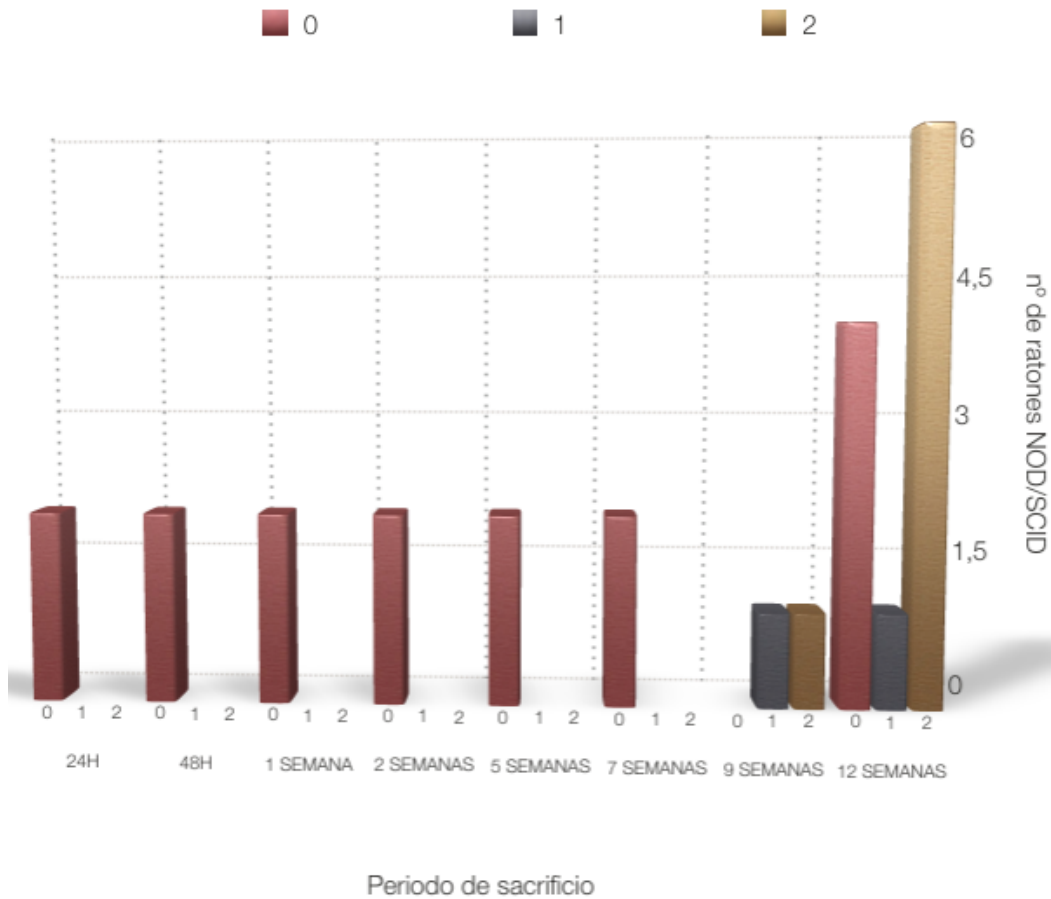


Figura 46. Evolución formación ósea ratones NOD/SCID de implante intramuscular de los casos (modelo de constructo tipo 1).

Al realizar una tabla de contingencia 2x2 no han sido halladas diferencias estadísticamente significativas en la formación ósea ni subcutánea ni intramuscular en las dos ramas de tratamiento ($p > 0,05$). Se ha obtenido un residuo corregido de 1,0 en la formación ósea subcutánea en función de la rama de tratamiento aplicado, lo que nos puede indicar una tendencia a la correlación. La muestra de los ratones controles es muy pequeña.

6.2 Análisis cualitativo de osteoblastos humanos en tejido óseo mediante inmunohistoquímica con anticuerpo anti-osteocalcina humana.

Implante subcutáneo

Se ha realizado estudio inmunohistoquímico, analizando la expresión de osteocalcina humana en la zona de implante del constructo de todos los ratones NOD/SCID del estudio.

Se han identificado células positivas para osteocalcina en el grupo I caso. En cada una de ellas se han identificado morfológicamente neutrófilos con positividad para la tinción inmunohistoquímica (Figura 47 y 48)

La presencia de células mononucleadas en el estroma medular, osteoblastos en fase activa (células de morfología cuboide) y células osteoprogenitoras quiescentes (morfología cilíndrica baja) dispuestos en la capa epiteliode del frente de avance fueron detectadas sólo en ratones del grupo I.

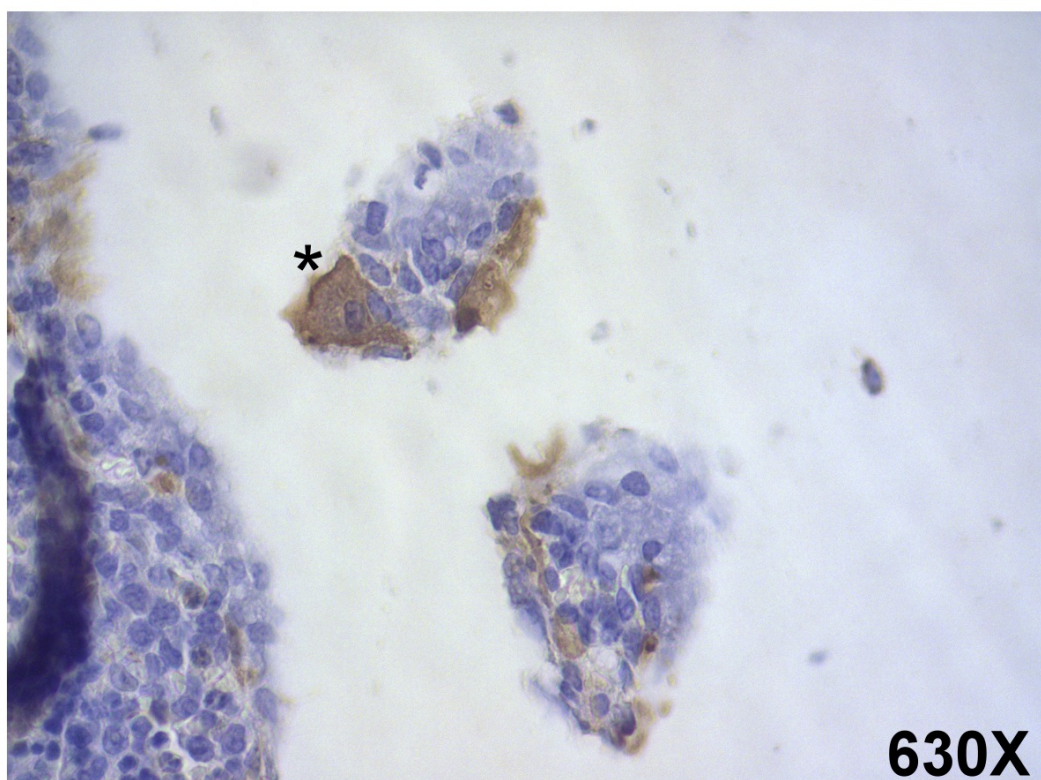


Figura 47. Imagen de sección de constructo MSCH-FTC-MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso a 630x con positividad para anticuerpo antiosteocalcina humana en la 12° semana postcirugía (Ratón 12N104).

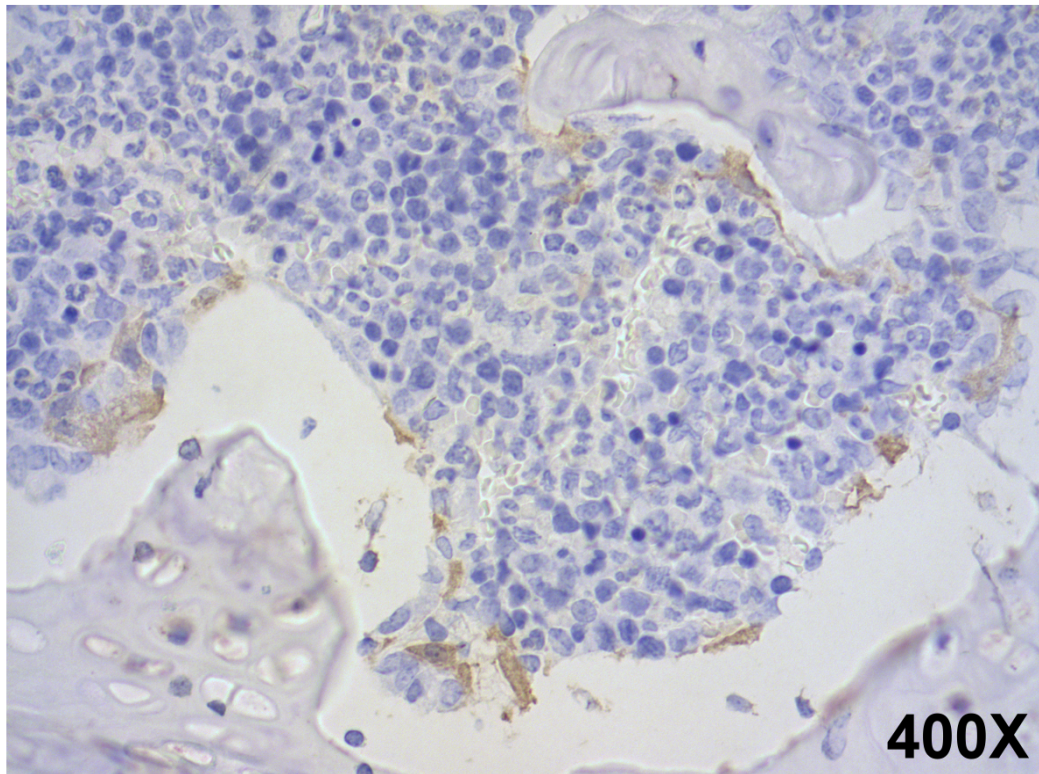


Figura 48. Imagen de sección de constructo MSC+FTC+MOD implantado en ratón NOD/SCID de grupo I caso a 400x con osteoblastos y osteocitos osteocalcina humana positivos en la 12° semana postcirugía. (Ratón 12N119).

En la tabla 40 se expone el número de ratones en los que se identificaron células osteoblásticas positivas en cada grupo de estudio para los implantes subcutáneos.

Tabla 40. N° de ratones NOD/SCID que presentan positividad a osteoblastos humanos (osteocalcina POSITIVOS). Implante subcutáneo.

	N° de ratones con osteoblastos humanos (osteocalcina POSITIVOS)	
	Sí	No
NOD/SCID grupo I caso (MSCH-FTC-MOD) (n=25)	17	8
NOD/SCID grupo II control (SF 0,9%-FTC-MOD) (n=5)	0	5

El 68% de los ratones del grupo I caso, desarrollaron osteoblastos humanos, sobretodo en aquellos ratones sacrificados a partir de la 7ª semana. No se detectaron osteoblastos en los ratones NOD/SCID del grupo II control.

Al aplicar el test χ^2 cuadrado observamos diferencias significativas en la expresión de osteocalcina humana en los distintos grupos ($p < 0,02$).

Implante Intramuscular

En la tabla 41 se expone el número de ratones en los que se identificaron células osteoblásticas positivas en cada grupo de estudio para los implantes intramusculares.

Tabla 41. N° de ratones NOD/SCID que presentan positividad a osteoblastos humanos (osteocalcina POSITIVOS). Implante intramuscular.

	N° de ratones con osteoblastos humanos (osteocalcina POSITIVOS)	
	Sí	No
NOD/SCID grupo I caso (MSCH-FTC-MOD) (n=25)	18	7
NOD/SCID grupo II control (SF 0,9%-FTC-MOD) (n=5)	0	5

El 72% de los ratones del grupo I caso, desarrollaron osteoblastos humanos, sobretodo en aquellos ratones sacrificados a partir de la 7ª semana. No se detectaron osteoblastos en los ratones NOD/SCID del grupo II control.

Al aplicar el test χ^2 cuadrado observamos diferencias significativas en la expresión de osteocalcina humana en los distintos grupos ($p < 0,02$).

6.3 Análisis cuantitativo de osteoblastos humanos en tejido óseo mediante inmunohistoquímica con anticuerpo anti-osteocalcina humana.

Se ha evaluado el número de osteoblastos humanos formados en los ratones del grupo I con el fin de estudiar de forma cuantitativa la osteoblastogénesis inducida, tanto en implante subcutáneo como intramuscular.

El conteo del número absolutos de osteoblastos identificados en 10 campos de gran aumento en el constructo por cada ratón NOD/SCID de cada uno de los grupos se expone en la siguiente tabla 42.

Tabla 42. Número de osteoblastos humanos osteocalcina POSITIVOS por cada 10 campos 400x.

	ID ratón	Implante Subcutáneo Nº	Implante Intramuscular Nº
NOD/SCID grupo I caso (MSCH-FTC+MOD) (n=25)	1	0	3
	2	0	0
	3	0	0
	4	0	0
	5	0	0
	6	5	4
	7	0	0
	8	0	0
	9	0	0
	10	10	2
	11	2	9
	12	3	10
	13	4	1
	14	6	5
	15	3	4
	16	24	7
	17	14	10
	18	3	6
	19	11	9
	20	10	10
	21	25	18
	22	1	5
	23	9	3
	24	19	50
	25	18	14
NOD/SCID grupo II control (SF 0,9%-FTC-MOD) (n=5)	26	0	0
	27	0	0
	28	0	0
	29	0	0

RESULTADOS

30	0	0
----	---	---

Los valores descriptivos media e intervalo de confianza y rango figuran en la la tabla 43.

Tabla 43. Media de N° de osteoblastos humanos osteocalcina POSITIVOS por cada 10 campos 400x implantados de forma subcutánea e intramuscular a los dos grupos.

	NOD/SCID grupo I caso (MSC+FTC+MOD) Subcutáneo (n=25)	NOD/SCID grupo I caso (MSC+FTC+MOD) Intramuscular (n=25)	NOD/SCID grupo II control (SSF 0,9%+FTC+MOD) (n=5)
Media	6,7	6,8	0
IC Mínimo	3,6	2,8	0
IC Máximo	9,8	10,8	0

Se han hallado diferencias estadísticamente significativas al aplicar la comparación de dos medias mediante un test no exacto entre el valor cuantitativo de osteoblastos osteocalcina positivo entre los ratones del grupo I y los ratones del grupo II para la implantación subcutánea ($p<0,001$).

Ha sucedido lo mismo entre el valor cuantitativo de osteoblastos osteocalcina positivo para la implantación intramuscular entre los ratones del grupo I y los ratones del grupo II ($p<0,001$).

Con el fin de establecer la correlación entre el valor cuantitativo de osteoblastos osteocalcina positivo (en su implante intramuscular y subcutáneo de ambos grupos de ratones NOD/SCID) y el grado de formación ósea visualizado histológicamente mediante la tinción hematoxilina-eosina, se ha realizado el test de Correlación de Pearson.

Se ha hallado una correlación entre la osteocalcina subcutánea y la visualización subcutánea de formación ósea. ($p < 0,0001$).

No se ha hallado correlación entre el valor de los osteoblastos osteocalcina positivos intramuscular y el grado de formación ósea de los implantes realizados intramuscularmente.

RESUMEN Análisis de eficacia del implante del constructo.

- No se han hallado diferencias estadísticamente significativas en la formación ósea ni subcutánea ni intramuscular entre los dos grupos ($p > 0,05$).
- La cirugía de implante subcutáneo del constructo se asoció a una mayor proporción de NOD/SCID que desarrollan con osteoblastos humanos con respecto a los del grupo control (68% vs 0%) ($p < 0,02$).
- La cirugía de implante intramuscular del constructo se asoció a una mayor proporción de NOD/SCID que desarrollan con osteoblastos humanos con respecto a los del grupo control (72% vs 0%) ($p < 0,02$).
- Se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre el valor cuantitativo de osteoblastos osteocalcina positivo (en su implantación subcutánea) entre los dos grupos ($p = 0,001$).
- Se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre el valor cuantitativo de osteoblastos osteocalcina positivo (en su implantación intramuscular) entre los dos grupos ($p = 0,001$).
- Se ha hallado una correlación entre el valor cuantitativo de osteocalcina en su implante subcutáneo y la visualización de formación ósea en el implante subcutáneo ($p < 0,0001$).

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Discusión

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este trabajo se diseñó siguiendo las pautas de un estudio preclínico necesario para poder realizar un ensayo clínico prospectivo fase I en 10 pacientes con osteonecrosis maxilar. Para realizar este estudio preclínico se usó un modelo murino, más concretamente la cepa NOD/SCID, siendo 30 ratones, el número mínimo necesario para la obtención de la aprobación del ensayo de la Agencia Española del Medicamento. Dado los altos costes que representaban la compra de ratones NOD/SCID diseñamos el estudio con 30 ratones. De estos 30 ratones, a 25 les sería implantado el constructo tipo 1 (MSC+FTC+MOD) y los 5 restantes se les implantaría el constructo tipo 2 (FTC+SSF 0,9%+MOD). A pesar de ello, la muestra continuó siendo pequeña, lo cual ha afectado a la significación estadística de los resultados.

2. TERAPIA CELULAR Y CÉLULAS MESENQUIMALES DE MEDULA ÓSEA.

El avance de terapias mediante el uso de células ha crecido considerablemente durante los últimos años, a pesar de ello, un estudio más exhaustivo de los mecanismos básicos subyacentes a la regeneración tisular, sería necesario dada la amplísima necesidad clínica de encontrar tratamientos eficaces para enfermedades que actualmente no disponen de ellos.

La terapia celular ha centrado su campo de investigación de diferentes patologías en las células madre debido a sus propiedades regenerativas (142). Sin embargo, debido a las consideraciones éticas, legales y de bioseguridad que conlleva el empleo de células madre embrionarias en la clínica, el uso de células madre adultas, más concretamente las células mesenquimales (MSC) humanas se ha visto incrementado vertiginosamente en los últimos años.

Además el aislamiento, expansión y control de las MSC es bien conocido, está adecuadamente protocolizado y resulta mucho menos complejo que el de células madre embrionarias (142). Por otra parte, las MSC derivadas de médula ósea se ha observado que presentan mayor poder osteogénico que las derivadas de grasa, que tienen mayor tendencia a diferenciarse a fibroblastos (143).

De cara a la terapia celular, la manipulación celular ex vivo debe ser estrictamente controlada, en condiciones de rigurosa asepsia y los medios y métodos de cultivo deben además de estar completamente definidos y caracterizados de forma que se garantice la bioseguridad del producto (144).

En base a estas y las anteriores consideraciones, la expansión celular in vitro se ha de realizar en una sala blanca y debe ser incluida dentro de los criterios necesarios para la producción celular definidos dentro de los

“buenos procedimientos de producción” (GMP, Good Manufacturing Practice) y que por tanto son evaluados rigurosamente por las agencias reguladoras competentes como la FDA (Food and Drug Administration) o el EMEA (European Medicines Agency).

La sala blanca de producción celular ha de mantener controlada de forma escrupulosa y rigurosa la temperatura, la humedad, el flujo y dirección de aire y la cantidad de partículas presentes en la misma. La Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) es la encargada en nuestro país de certificar que así sea.

El uso de sala blanca será fundamental en aquellos estudios que planteen manipular células ex vivo, del laboratorio a la práctica clínica.

Desde el año 2013, el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia cuenta con una sala blanca, destinada a dar asistencia a los diferentes ensayos clínicos de terapia celular que se encuentran en ejecución, entre los cuales se encuentra el el ensayo de clínico de osteonecrosis maxilar, cuyo estudio preclínico es objeto de esta Tesis.

Los estudios con MSC han reportado considerables beneficios clínicos para el paciente y no han manifestado poseer riesgos para la salud de los individuos tras el trasplante. La regeneración del tejido óseo en condiciones normales se produce de forma natural debido a la existencia en el organismo de las células madre que presentan capacidad de autorrenovación y de diferenciación.

Esta capacidad se ve disminuida con la edad y mermada también en presencia de muchas enfermedades degenerativas, isquémicas, inflamatorias o tumorales.

Centrándonos en el campo de la cirugía oral y maxilofacial en los últimos años ha habido un mayor número de estudios clínicos con células mesenquimales en humanos:

Meijer y cols. (145) realizaron un estudio en 6 pacientes a los cuales se les implantó células mesenquimales con el fin de regenerar hueso alveolar en mandíbula. A los 4 meses del trasplante, 3 de ellos presentaron regeneración ósea en la zona de estudio. Para los autores de este estudio solamente en uno de los casos la regeneración ósea es atribuible a células mesenquimales.

En otro ensayo, d'Aquino y cols. (146) demostraron regeneración ósea con células mesenquimales procedentes de pulpa dental. Tras la extracción de terceros molares se implantó en la zona de la extracción un constructo formado con células procedentes de pulpa y colágeno y se analizó la neoformación ósea a los 3 meses comparándolo con un grupo control a los cuales no se les implantó nada. Los estudios radiológicos e histológicos revelaron una mejor formación ósea que el grupo control.

En intervenciones de elevación de seno maxilar, también se han usado células mesenquimales humanas. Más concretamente Zou D y cols. (147) realizaron un estudio en 9 cabras a las que realizaron 18 elevaciones de seno donde utilizaron MSC y cemento fosfato cálcico como material de injerto. Tres meses después, el estudio histomorfométrico mostró una tasa mayor de formación ósea y mineralización más temprana que en el grupo del cemento fosfato cálcico y que en el grupo de hueso autólogo.

Riecke y cols. (148) diseñaron un estudio en conejos en los que observaron una mejor estabilidad de los implantes colocados tras realizar elevaciones de seno con células mesenquimales autólogas. Del mismo modo, las propiedades biomecánicas de los mismos eran superiores a las del grupo en los que introdujeron únicamente un sustituto óseo.

En 2011 Rickert y cols (149) diseñaron un estudio en 12 pacientes que requerían elevaciones de seno bilateral. Injertaron aleatoriamente un seno maxilar con xenoinjerto (BiOss ®) y MSC y el otro seno maxilar con xenoinjerto (BiOss ®) y hueso autólogo extraído de la región retromolar.. Catorce semanas después, el análisis histomorfométrico mostró

significativamente más formación ósea en el grupo de MSC (18%) que en el control (12%).

En un estudio con 6 pacientes Shayesteh y cols. (150) realizaron igualmente la elevación de seno con MSC cultivadas en FTC e hidroxiapatita y colocación de 30 implantes. Solamente 2 fracasaron y encontraron una tasa de regeneración ósea del 41,32%.

En el uso de células mesenquimales en osteonecrosis maxilar (ONM) secundaria a bifosfonatos o radioterapia, los únicos estudios que usan la terapia celular son el de Cella y cols. (100) que emplearon las células mononucleadas autólogas para el tratamiento de la osteonecrosis maxilar secundaria a bisfosfonatos con Spongostan® como soporte en un caso, en el cual, observaron osificación concéntrica en la zona en TC tras 15 meses.

Mendonça y cols. (151) presentaron del mismo modo de forma satisfactoria la regeneración ósea en 3 pacientes a los que se les implantó un constructo formado por un cultivo de MSC en fosfato tricálcico.

Nuestro grupo de investigación, ha utilizado en 3 pacientes, la porción de células mononucleadas autólogas extraídas de cresta ilíaca. Esta porción de células ha sido mezclada con FTC y MOD obteniendo resultados prometedores que nos llevaron a plantear el ensayo clínico EC11-009: En fase I de utilización de células mesenquimales de médula ósea autólogas sembradas sobre matriz porosa de fosfato tricálcico y matriz ósea desmineralizada en pacientes con osteonecrosis maxilar. (152-153).

Dado que todos estos estudios avalan el uso de células mesenquimales, consideramos que la elección de modelo celular para la realización de nuestro constructo debía ser de células mesenquimales humanas procedentes de médula ósea. Siendo esta la técnica de elección para realizar el presente estudio.

3. SEGURIDAD EN EL USO DEL CONSTRUCTO (FTC+MSC+MOD).

Uno de los objetivos de esta tesis ha sido evaluar la seguridad en el modelo animal, del implante subcutáneo/intramuscular del constructo formado por (FTC+MSC+MOD). Para ello se ha establecido una metodología de manipulación de las células mesenquimales, cirugía y posterior análisis, protocolizada, práctica y de fácil seguimiento.

Con nuestra metodología de trabajo, hemos podido implantar de manera subcutánea e intramuscular de forma satisfactoria y en a penas unos minutos de cirugía, el constructo en el modelo de ratón inmunodeprimido NOD/SCID.

Al evaluar la seguridad del procedimiento hemos analizado las variables clínicas del animal, así como tras su necropsia, análisis histopatológico y hematológico con el fin de poder establecer la seguridad del procedimiento.

Además hemos observado que es un procedimiento sencillo, sin secuelas ni complicaciones para el animal, que en ningún caso requirió tratamiento posterior a la cirugía. Estos datos tienen importancia práctica a la hora de extrapolar la cirugía al humano.

4. TOXICIDAD AGUDA Y CRÓNICA DEL IMPLANTE FTC+MSC+MOD.

Una de las premisas de nuestro estudio fue determinar la biocompatibilidad y/o toxicidad del constructo en el modelo murino.

La implantación de un biomaterial se asocia sobre todo con una respuesta inflamatoria aguda o toxicidad subletal. Las reacciones inflamatorias podrían inducir la infiltración de polimorfonucleares, leucocitos, macrófagos, fibroblastos y linfocitos, y tanto la respuesta inflamatoria aguda y la toxicidad subletal puede durar de días a semanas, dependiendo del tipo de material del que esté hecho el constructo (154).

En nuestro trabajo comprobamos mediante el índice de bienestar animal (140) que el 100% de la muestra sobrevivió durante las primeras 48 horas y que además este índice obtuvo un valor medio de 0 con lo que demostramos la correcta biocompatibilidad del constructo FTC+MSC+MOD y la ausencia de toxicidad aguda. De igual modo, tampoco encontramos evidencia de toxicidad crónica durante todo el tiempo de estudio. El índice de bienestar animal fue de 0. Además los ratones experimentaron un acorde incremento de peso según su edad y no hubo ninguna baja. No encontrando diferencias significativas con respecto al peso según el tipo de constructo implantado.

También estudiamos la toxicidad realizando un análisis bioquímico y sanguíneo a todos los ratones tras su sacrificio, viendo igualmente que no eran halladas ningún tipo de diferencias entre los dos grupos de estudio en los diferentes parámetros analizados.

Diferentes estudios han determinado que la combinación de FTC con otros materiales como el β -fosfato tricálcico/ carboxymethyl-chitin no afecta a la toxicidad del constructo. Muramatsu y cols. (155) no encontraron

toxicidad aguda en un estudio con ratas donde se implantó el constructo β -fosfato tricálcico /carboxymethyl-chitin en fémur y se evaluó la toxicidad durante 4 semanas.

Otro estudio de toxicidad y biocompatibilidad de factores de crecimiento rico en plaquetas en combinación con β -fosfato tricálcico y colágeno I mostraron que todas las posibles combinaciones no resultaron ser ni mutagénicas, ni hemolíticas, ni citotóxicas, ni pirogénicas o alergénicas. Además no hubo evidencia de toxicidad ni local ni sistémica y todas las combinaciones factores de crecimiento rico en plaquetas en combinación con los materiales probados, fueron biocompatibles después de la implantación intramuscular (156).

También realizamos un análisis histopatológico de diferentes órganos en cada ratón, en busca de posibles signos patológicos de toxicidad aguda o crónica o tumorigenicidad. El análisis histopatológico de todos los órganos fue normal. En el bazo se observaron los hallazgos típicos de la cepa NOD / SCID (ausencia de nódulos linfáticos) con excepción de una muestra de ratón en la que se observó la presencia de vainas y folículos linfoides, probablemente debido a que el ratón adquirió inmunidad durante el periodo de estudio. Esto se confirmó mediante al análisis sanguíneo. Cuyas cifras de linfocitos se encontraban elevadas. En 6 ratones (5 del grupo I y uno del grupo II) se observaron en el pulmón áreas localizadas de infiltrado intersticial que igualmente no eran atribuibles al tipo de constructo implantado.

5. BIODISTRIBUCION DEL CONSTRUCTO (MSC+FTC +MOD).

Una consideración importante en la seguridad de los ensayos de ingeniería de tejidos es conocer biodistribución de las células injertadas, como una necesidad para definir su potencial de estabilidad, diferenciación y la persistencia en tejidos diana y no diana.

La biodistribución se puede ver afectada por la vía de administración; un producto administrado por vía intravenosa tiene un potencial de distribución muy diferente a un producto en el que las células se adhieren a los andamios (*scaffolds*) o en el que las células localmente inyectan en un tejido específico (157).

Diferentes autores determinan que si se produce la infusión de células mesenquimales por vía intravenosa, se puede observar la presencia de estas células en pulmones, mientras cuando se inyectan de forma local, las células injertadas se mantienen durante un largo tiempo en el sitio de inyección (158). En cambio, Toupet y cols (159) en otro estudio, realizó la infusión de células MSC mediante inyección articular; el estudio de biodistribución mostró secuencias Alu humanas en corazón, bazo, intestino, cerebro y testículo, aunque esta detección fue muy baja y poco común, ya que sólo se encontró en un 10-20 % de los ratones analizados.

En el presente estudio, nuestros resultados sugieren que la células mesenquimales preincubadas en FTC y posteriormente mezcladas con la MOD y colocadas en ratones tanto a nivel subcutáneo como intramuscular,

se mantuvieron en el sitio de implantación durante todo el estudio en el 100% de la muestra; en el estudio cinético realizado, no hemos encontrado células humanas en tejidos como los pulmones, el hígado, el bazo, los riñones, el corazón, el cerebro y las gónadas. Estos resultados confirmaron que células mesenquimales implantadas se mantuvieron en el constructo FTC+MOD y proporcionan evidencia de la falta de difusión de estas células hacia otros tejidos.

Esto concuerda con lo sugerido por otros autores e indica que las células implantadas son capaces de sobrevivir hasta 6 semanas después de la implantación (160, 161).

6. EFICACIA DEL CONSTRUCTO (MSC+FTC+MOD).

La plasticidad osteogénica de las células mesenquimales es una propiedad muy atractiva en el campo de la regeneración ósea en el territorio maxilofacial, ya que muchos pacientes presentan defectos óseos a nivel maxilar subsecuentes a enfermedades como la osteonecrosis, a atrofas óseas o quistes. La implantación de células mesenquimales para regenerar el hueso necesario con una plataforma osteoinductora como es el β -fosfato tricálcico y la matriz ósea desmineralizada, es motivo de intensa investigación animal y de incipientes ensayos clínicos (162-165). Otro de los objetivos de nuestro trabajo ha sido intentar obtener resultados preliminares sobre la posible eficacia regenerativa del implante del constructo. Para ello hemos realizado un estudio comparativo de formación ósea del constructo formado por FTC +MSC+MOD en un grupo, y FTC+ SSF 0,9%+MOD en el otro.

Las MSC tienen capacidad para diferenciarse a células osteoblásticas, adipocíticas y condroblásticas y como puede verse en la Figura 6, nuestros resultados confirman la capacidad de diferenciación osteoblástica de las MSC.

El β -fosfato tricálcico es un biomaterial ampliamente utilizado para la regeneración ósea. Por otro lado, es conocido además que en el campo de la regeneración ósea, el uso de células mesenquimales no es suficiente para que estas obtengan la señal de diferenciación a osteoblastos. Se necesita una matriz o sustrato como el β -fosfato tricálcico y las proteínas de diferenciación morfogénica (BMP) son potentes inductores de la diferenciación osteoblástica in vitro y la regeneración ósea in vivo (166-168). Además se conoce el potencial osteogénico del β -fosfato tricálcico depositado de forma

extraesquelética, tanto subcutánea, como intramuscular en diferentes modelos animales (169).

La degradación in vivo de las células y del constructo se debe a dos procesos, su disolución por parte del líquido extracelular por una parte y la reabsorción celular por otra (170). En nuestro estudio se encontró alto porcentaje de matriz extracelular asociada a una importante proliferación de tejido conectivo que pensamos que ha frenado la reabsorción de la matriz.

Ensayos en 4 perros como el de Xie y cols (171) muestran como tiene lugar la formación de tejido óseo a partir de un cultivo de células mesenquimales en β FTC implantado subcutáneamente. Al contrario de lo observado en algunos estudios como el de Yang y cols. (172) en cerdos y perros, en nuestro ensayo, los primeros indicios de osteorregeneración se producen a partir de la semana 7 de forma subcutánea y a partir de las 9 semanas de forma intramuscular. Esto en realidad puede ser porque a diferencia de su estudio, en el que fue implantado el FTC solamente, en el nuestro se asoció el cultivo de células madre mesenquimales en el FTC y posteriormente fue mezclado con MOD. Pensamos que es un proceso que es favorecido por el uso de MSC. Es además a expensas de osificación endondral.

Con respecto al desarrollo en la formación de tejido óseo, este sigue una secuencia gradual: Tras la deposición del material, se crea inicialmente a su alrededor un tejido inflamatorio que se continúa con la proliferación de tejido fibroblástico. Posteriormente se va depositando matriz extracelular que junto con la matriz o sustrato va madurando y finalmente mineraliza (122,173,174). Los resultados de nuestro trabajo concuerdan con esta secuencia, observando en las primeras semanas y tanto en su implante subcutáneo e intramuscular como se produce un infiltrado inflamatorio

asociado al material y posteriormente como va apareciendo proliferación de tejido conectivo hasta que a partir de las 7-9 semanas se va observando un tejido similar al óseo con zonas de diferenciación cartilaginosa y finalmente se vio tejido óseo laminar.

El método de detección ideal de núcleos osteocálcicos es mediante tinción con tricrómico de Masson o Alizarin Red. No obstante determinados anticuerpos identifican moléculas que son compatibles con la caracterización osteoblástica como es RUNx2, Osteocalcina, Osteopontina y colágeno tipo I entre otros. De hecho, existen estudios que valoran la diferencia entre un osteoblasto y una célula osteoblástica obtenida a partir de células madre mesenquimales, y se han encontrado diferencias a nivel de los genes que regulan la maduración celular, la adhesión y la producción de elementos citoesqueléticos, que deben ser estudiados con atención (175).

En este sentido, nos ha parecido apropiado valorar la misma mediante el estudio anatomopatológico del constructo, empleando la tinción de hematoxilina-eosina, el tricrómico de Masson y la inmunohistoquímica con anticuerpos anti-osteocalcina. El primero de los grupos, al que se le implantó FTC+MSC+MOD, consiguió los mejores resultados de diferenciación osteoblástica y osteoinducción que el segundo, como es lógico. Existiendo una asociación estadísticamente significativa en los valores de osteocalcina y el grado de formación ósea visto mediante la tinción hematoxilina-eosina.

En el grupo que únicamente se implanta el constructo FTC+SSF 0,9%+MOD se produce un endurecimiento del material implantado, de carácter acelular, rodeado por una cápsula fibroblástica inflamatoria. De esta se desconocen sus propiedades mecánicas tan necesarias en el campo de la regeneración ósea.

A pesar de todo, no hemos obtenido resultados estadísticamente significativos en el grado de diferenciación ósea entre los dos grupos, aunque si que parece observarse una tendencia a ello, probablemente limitado por el tamaño muestral.

En modelos animales de defectos óseos mandibulares también se están encontrando resultados esperanzadores con el uso de células madre mesenquimales de médula ósea. En un estudio en minicerdos, el empleo de sustitutos óseos tipo Bioss®, enriquecidos con células madre de médula ósea, tuvieron mayor capacidad de formación de hueso, que aquellos en los que se habían utilizado células madre de forma aislada (176). Nuestros resultados sugieren que el cultivo de las células madre mesenquimales en fosfato tricálcico y posteriormente mezclándolas con matriz ósea desmineralizada puede también utilizarse como constructo para este tipo de ensayos. Por tanto, existen multitud de aplicaciones para terapia celular en cirugía maxilofacial como como la necrosis ósea secundaria a la ingesta de bifosfonatos (100, 151, 152, 170) o bien en deformaciones faciales congénitas (177) en las que se podría aplicar de forma eficaz y más sencilla que hasta el momento. El estudio de Ye y cols (163) de características muy similares al nuestro, se implantaban de forma subcutánea células madre mesenquimales cultivadas en fosfato tricálcico, observando un mayor poder osteogénico si eran diferenciadas in vitro previamente, lo que nos sugiere una perspectiva para a futuros estudios.

PERSPECTIVAS FUTURAS.

El concepto de terapia celular define un campo de estudio que parte de ensayos en numerosos modelos animales donde, tras demostrar su capacidad de regeneración tisular, ha confirmado mediante ensayos clínicos la existencia de reparación tisular en seres humanos.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, el constructo formado por (FTC+MSC+MOD) puede considerarse como no dañino para el ser humano y presenta un gran potencial de futuro en el campo de la regeneración ósea con terapia celular.

En lo que se refiere a la eficacia regenerativa, los datos obtenidos en esta tesis doctoral serán igualmente la base para continuar una línea de investigación en un modelo animal de enfermedad, con osteonecrosis maxilar para posteriormente trasladarlo al tratamiento en humanos. Con este modelo pretendemos que se confirme la capacidad de integración y diferenciación de estas células, cultivadas en fosfato tricálcico, hacia osteoblastos y por tanto en hueso maduro.

Paralelamente, el objetivo final, es la puesta en marcha de un ensayo clínico de terapia celular en pacientes con osteonecrosis maxilar. Para ello se realizará, del mismo modo, la implantación del constructo en el defecto óseo maxilar. Esto, nos permitirá estudiar “in vivo” su capacidad osteorregenerativa y eficacia para el tratamiento de estas enfermedades.

Los resultados de este trabajo han servido de base para el diseño de un nuevo estudio comparando dos fuentes mesenquimales para el tratamiento

de osteonecrosis maxilar. Este estudio ha recibido financiación nacional en la convocatoria FIS 2013 (PI13/02699) , que se esta llevando acabo desde este año (2014) hasta diciembre del 2016 y está coordinado con el Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital la Paz de Madrid. El proyecto consta de dos partes. En la primera parte se provoca osteonecrosis maxilar en un modelo de rata mediante la administración intraperitoneal de ácido zolendrónico; además se realiza extracción de la dentición molar. En un grupo de ratas se implanta un constructo MSC+FTC+MOD, o bien con células mesenquimales procedentes de médula ósea o procedentes de tejido adiposo. La segunda parte del proyecto consistirá en realizar un ensayo clínico fase I/II en pacientes con osteonecrosis maxilar con la fuente de células mesenquimales que haya sido elegida en función de los resultados obtenidos en el modelo animal.

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, podemos deducir las siguientes conclusiones:

1. El implante subcutáneo o intramuscular del constructo FTC+MSC+MOD no ha mostrado signos de toxicidad aguda o crónica en el modelo murino NOD/SCID.
2. Tras la implantación del constructo FTC+MSC+MOD implantado de forma subcutánea o intramuscular en el modelo murino NOD/SCID no han sido halladas células mesenquimales humanas en ningún órgano. Permaneciendo las células en el lugar del implante.
3. No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre el poder osteogénico del constructo FTC+MSC+MOD. Aunque si existen entre el poder osteogénico del implante subcutáneo e intramuscular.
4. La formación de tejido óseo estructurado se ha observado a partir de la semana 7 en la zona de implante subcutánea y a partir de la semana 9 en la zona de implante intramuscular.

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Bibliografía

1. Buck DW 2nd, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg.* 2012; 129 (6): 1314-20.
2. Tavassoli M, Yoffey JM. Bone Marrow Structure and function. *Scandinavian Journal of Haematology.* 1984; 32 (3): 335.
3. Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 2001; 10 (2): 86-95.
4. Guyton CA & Hall JH: Tratado de fisiología médica, McGraw-Hill, 10ª, México, 2004.
5. Garnet LP, Hyat JL. Compendio de Histología. 2º ed. Mc Graw Hill. Interamericana; 2002.
6. Nyman JS, Anuradha R, Shen X, Acuna RL, Tyler JH, Wang X. The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone. *J Biomech* 2006; 39: 931-8.
7. Termine JD. Bone Matrix Proteins and Mineralization Process. En: Favus MJ. ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, Second Edition Nueva York: Raven Press, 1993: 21-24.
8. Fernández-Tresguerres I, Alobera MA, del Canto M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 2006; 11 (1): 47-51.
9. Gurley AM, Roth SI. Bone. En Sternberg SS, ed. *Histology for Pathologists*. New York: Raven Press, 1992: 61-80.

10. Friedenstein AJ. Stromal Mechanisms of Bone Marrow: Cloning In Vitro and Replantation In Vivo. Immunobiology of Bone Marrow Transplantation. Berlin. Thienfelder S (ed) Springer-Verlag; 1980. 19-29.
11. Mackie EJ: Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. Int J Biochem Cell Biol 2003; 35 (9): 1301-5.
12. Junqueira LC, Carneiro J. Histología básica. 6º ed. Barcelona: Masson; 2005.
13. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM: Bone growth factors. Orthop Clin North Am 2000; 31 (3): 375-88.
14. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ: Function of the osteocytes in bone. J Cell Biochem 1994; 55 (3): 287-99
15. Gehron-Robey P: The biochemistry of bone. Endocrinol Metab Clin North Am 1989; 18 (4): 858-902.
16. Pierce AM, Lindskog S, Hammarström L: Osteoclasts: structure and function. Electron Microsc Rev 1991; 4 (1):1-45.
17. Carlson, Bruce M. Embriología Humana y Biología del Desarrollo. 4a ed. Madrid: Elsevier; 2009.
18. Nie X, Luukko K, Kettunen P. BMP signaling in craniofacial development. Int. J. Dev. Biol. 2006; 50 (6): 511- 21.
19. Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and genetic disease. Genes Dev. 2002; 16 (12): 1446-65.
20. Vacanti CA, Bonassar U. An overview of tissue engineered bone. Clin Orthop 1999; 367: 375-81.

21. Ebrahein NA, Elgafy H, Rongming X. Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: Techniques and complications. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9 (3): 210-218.
22. Moraleda JM, Ruiz F, Blanquer M, Arriba F. ¿Que son las células madre? *Hematología Mol* 2004; 3: 2-5.
23. Moraleda JM, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Ruiz F, Bonilla S, et al. Adult stem cell therapy: dream or reality? *Transpl Immunol* 2006; 17(1): 74-7.
24. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 2000; 287(5457): 1442-6.
25. McKay R. Stem cells--hype and hope. *Nature* 2000; 406(6794):361-4.
26. Temple S. Stem cell plasticity--building the brain of our dreams. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(7):513-20.
27. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004; 116 (6): 769-78.
28. Barquinero J, Pellicer M, Pétriz J. Therapeutic applications of stem-cells. *Med Clin (Barc)* 2005; 124(13): 504-11.
29. Wobus AM, Holzhausen H, Jäkel P, Schöneich J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 1984; 152(1): 212-9.
30. Prella K, Vassiliev IM, Vassilieva SG, Wolf E, Wobus AM. Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species--present status and future prospects. *Cells Tissues Organs*; 165(3-4): 220-36.

31. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
32. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(12): 7634-8.
33. Smith AG. Mouse embryo stem cells: their identification, propagation and manipulation. *Semin Cell Biol* 1992; 3(6): 385-99.
34. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
35. Thomson JA, Odorico JS. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends Biotechnol* 2000; 18(2): 53-7.
36. Martín-Ibáñez R, Urbán N, Sergent-Tanguy S, Pineda JR, Garrido-Clua N, Alberch J et al. Interplay of leukemia inhibitory factor and retinoic acid on neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Neurosci Res* 2007; 85(12): 2686-701.
37. Unger C, Skottman H, Blomberg P, Dilber MS, Hovatta O. Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Hum Mol Genet* 2008; 17(1): 48-53.
38. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380(6569): 64-6.
39. Campbell KH. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning* 1999; 1(1): 3-15.

40. Campbell KH, Fisher P, Chen WC, Choi I, Kelly RD, Lee JH et al. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Theriogenology* 2007; 68 Suppl 1: 214-31.
41. Niemann H, Tian XC, King WA, Lee RS. Epigenetic reprogramming in embryonic and fetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction* 2008; 135(2): 151-63.
42. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
43. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 101-6.
44. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008; 321(5889): 699-702.
45. Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008; 454(7204): 646-50.
46. Park IH, Lerou PH, Zhao R, Huo H, Daley GQ. Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2008; 3(7): 1180-6.
47. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451(7175): 141-6.

48. Park IH, Daley GQ. Human iPS cell derivation/reprogramming. Curr Protoc Stem Cell Biol 2009; Chapter 4:Unit 4A.1.
49. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105(8): 2883-8.
50. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. Nat Biotechnol 2008; 26(11): 1276-84.
51. Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. Nature 2009; 457(7227): 277-80.
52. Choi KD, Yu J, Smuga-Otto K, Salvagiotto G, Rehrauer W, Vodyanik M et al. Hematopoietic and Endothelial Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cells 2009; 27(3): 559-567.
53. Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. Blood 2009;113(22):5476-9
54. Davy P, Allsopp R. Balancing out the ends during iPSC nuclear reprogramming. Cell Stem Cell 2009; 4(2): 95-6.
55. Marion RM, Strati K, Li H, Tejera A, Schoeftner S et al. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2009; 4(2): 141-54.

56. Stevens LC. Teratocarcinogenesis and spontaneous parthenogenesis in mice. *Results Probl Cell Differ* 1980; 11: 265-74.
57. Noguchi T, Stevens LC. Primordial germ cell proliferation in fetal testes in mouse strains with high and low incidences of congenital testicular teratomas. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69(4): 907-13.
58. Stevens LC. Germ cell origin of testicular and ovarian teratomas. *Transplant Proc* 1984; 16(2): 502-4.
59. Walt H, Oosterhuis JW, Stevens LC. Experimental testicular germ cell tumorigenesis in mouse strains with and without spontaneous tumours differs from development of germ cell tumours of the adult human testis. *Int J Androl* 1993; 16(4): 267-71.
60. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ et al. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(1): 113-8.
61. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119(7): 1001-12.
62. Temple S. The development of neural stem cells. *Nature* 2001; 414(6859):112-7.
63. Ryder EF, Snyder EY, Cepko CL. Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J Neurobiol* 1990; 21(2): 356-75.

64. Snyder EY, Deitcher DL, Walsh C, Arnold-Aldea S, Hartwig EA, Cepko CL. Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 1992; 68(1): 33-51.
65. Taupin P. Adult neural stem cells: The promise of the future. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2007; 3(6): 753-60.
66. Amici AW, Yamato M, Okano T, Kobayashi K. The multipotency of adult vibrissa follicle stem cells. *Differentiation* 2009; 77(3): 317-23.
67. Sart S, Schneider YJ, Agathos SN. Ear mesenchymal stem cells: an efficient adult multipotent cell population fit for rapid and scalable expansion. *J Biotechnol* 2009; 139(4): 291-9.
68. Mouiseddine M, Mathieu N, Stefani J, Demarquay C, Bertho JM. Characterization and histological localization of multipotent mesenchymal stromal cells in the human postnatal thymus. *Stem Cells Dev* 2008; 17(6): 1165-74.
69. Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, Price G, Pelekanos R, Rossetti T et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2008;17(6): 1095-107.
70. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 759-806.

71. Eglitis M.A., Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Neurobiology* 1997; 94: 4080-85.
72. Bjornson C.R.; Reietze R.L.; Reynolds B.A.; Magli M.C. , Vescovi A.L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999; 283:534-37.
73. Fuchs E., Segre J.A. Stem Cells: A New Lease on Life. *Cell* 2000; 100:143-155.
74. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration and units in evolution. *Cell* 2000; 100:157-68.
75. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 938-52.
76. Herzog E, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483-93.
77. Devescovi V1, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov.* 2008 Dec;92(3):161-8.
78. Stiff PJ, Veum-Stone J, Lazarus HM, et al. High-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation for ovarian cancer: An autologous blood and marrow transplant registry report. *Ann Intern Med* 2000; 133: 504-15.
79. Hanazawa K, Tanaka M, Watanabe R, Fujime M. Collection of peripheral blood stem cells with granulocyte-colony-stimulatin factor alone in testicular cancer patients. *Int J Urol* 2000; 7: 77-82.

80. Verburg RJ, Kruize AA, van den Hoogen FH, Fibbe WE, Petersen EJ, Preijers F et al. High-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with rheumatoid arthritis: results of an open study to assess feasibility, safety, and efficacy. *Arthritis Rheum* 2001; 44(4): 754-60.
81. Ziegner UH, Ochs HD, Schanen C, Feig SA, Seyama K, Futatani T et al. Unrelated umbilical cord stem cell transplantation for X-linked immunodeficiencies. *J Pediatr* 2001; 138(4):570-3.
82. Robinson D, Ash H, Yayon A, Nevo Z, Aviezer D. Characteristics of cartilage biopsies used for autologous chondrocytes transplantation. *Cell Transplant* 2001; 10(2):203-8.
83. Menasché P, Hagège AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357 (9252): 279-80.
84. Matthes-Martin S, Peters C, Königsrainer A, Fritsch G, Lion T, Heitger A et al. Successful stem cell transplantation following orthotopic liver transplantation from the same haploidentical family donor in a girl with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2000; 96(12): 3997-9.
85. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; 4(1-2):7-25.
86. Tang M, Miyamoto Y, Huang EJ. Multiple roles of {beta}-catenin incontrolling the neurogenic niche for midbrain dopamine neurons. *Development* 2009; 136(12):2027-38.

87. Basak GW, Srivastava AS, Malhotra R, Carrier E. Multiple myeloma bone marrow niche. *Curr Pharm Biotechnol* 2009; 10(3):345-6.
88. Gillette JM, Larochelle A, Dunbar CE, Lippincott-Schwartz J. Intercellular transfer to signalling endosomes regulates an ex vivo bone marrow niche. *Nat Cell Biol* 2009; 11(3):303-11.
89. Walker MR, Stappenbeck TS. Deciphering the 'black box' of the intestinal stem cell niche: taking direction from other systems. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24(2):115-20.
90. Harada H, Ohshima H. New perspectives on tooth development and the dental stem cell niche. *Arch Histol Cytol* 2004; 67(1):1-11.
91. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003; 18(4):696-704.
92. Hunt DP, Morris PN, Sterling J, Anderson JA, Joannides A, Jahoda C et al. A highly enriched niche of precursor cells with neuronal and glial potential within the hair follicle dermal papilla of adult skin. *Stem Cells* 2008; 26(1):163-72.
93. Vacanti CA, Bonassar U, Vacanti MP, Shufflebarger J. Brief report: replacement of an avulsed phalanx with tissue engineered bone. *N Engl J Med* 2001; 344 (20):1511-4.
94. Connolly J. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop* 1995; 313: 8-18.
95. Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF. The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics* 1995; 18 (12): 1153-8.

96. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AL. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res* 1989; 7 (4): 568-78.
97. Chapman MW, Bucholz R, Cornell C. Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79 (4): 495-502.
98. Edgar CM, Barnes G, Kakar S, Gerstenfeld LC. Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic protein mediates the osteogenic differentiation in murine bone marrow stromal cell. *Bone* 2007; 40 (5):1389-1398.
99. Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg Br* 2005; 87 (7): 897-902.
100. Cella L, Oppici A, Arbasi M, Moretto M, Piepoli M, Vallisa D. et al. Autologous bone marrow stem cell intralesional transplantation repairing bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw. *Head Face Med*. 2011 17: 7-16.
101. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AL, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6 (2): 230-47.
102. Tavassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science* 1968;161 (3836): 54-6.

103. De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, et al. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum* 2006; 54 (4):1209-21.
104. Goshima J, Goldberg V, Caplan IA. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop* 1991; 269: 274-83.
105. Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AL. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant* 1992; 1(1): 23-32.
106. Kasten P, Vogel J, Luginbuhl R, Niemeyer P, Tonak M, et al. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials* 2005; 26 (29): 5879-89.
107. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(27):5474-91.
108. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*. 2001; 7(6): 679-89.
109. Walgenbach KJ, Voigt M, Riabikhin AW, Andree C, Schaefer DJ, Galla TJ et al. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery.. *Anat Rec*. 2001; 263(4): 372-8.

110. Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chem Eng Res Design* 2007; 85 (7): 1051-64.
111. Jiang T1, Kumbar SG, Nair LS, Laurencin CT. Biologically active chitosan systems for tissue engineering and regenerative medicine. *Curr Top Med Chem*. 2008;8(4):354-64.
112. Hutmacher DW, Cool S. Concepts of scaffold-based tissue engineering--the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *J Cell Mol Med*. 2007 Jul-Aug;11(4):654-69.
113. Yeo IS, Oh JE, Jeong L, Lee TS, Lee SJ, Park WH, Min BM. Collagen-based biomimetic nanofibrous scaffolds: preparation and characterization of collagen/silk fibroin bicomponent nanofibrous structures. *Biomacromolecules*. 2008 Apr;9(4): 1106-16.
114. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2004; 71(2): 343-354.
115. De la Puente P, Ludeña D. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Exp Cell Res*. 2014 Mar 10;322(1):1-11.
116. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J. Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. *Biomaterials* 2004; 25(15): 2997-3004.
117. Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, Chalabi K, Sachweh JS, Demircan L, Messmer BJ, Turina M. Fibrin gel advantages of a

- new scaffold in cardiovascular tissue engineering. Eur J Cardithorac Surg 2001; 19 (4): 424-430.
118. Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. J Cell Physiol 2005; 203 (3) : 465-470.
119. Groot KD. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. Biomaterials. 1980;1(1): 47-50.
120. Klein CP, de Blieck-Hogervorst JM, Wolke JG, de Groot K. Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles in vitro. Biomaterials. 1990; 11(7): 509-12.
121. Okumura M, Ohgushi H, Tamai S. Bonding osteogenesis in coralline hydroxyapatite combined with bone marrow cells. Biomaterials. 1991;12(4): 411-6.
122. Martínez I, Velásquez P, Meseguer-Olmo L, De Aza P. Production and study of in vitro behaviour of monolithic α -tricalcium phosphate based ceramics in the system $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$. Ceramics International 2011 Sep; 37 (7): 2527–35.
123. Ikada DE. Challenges in tissue engineering. En Journal of The Royal Society Interface. 01/11/2006;3(10):589-601
124. Anderson JM. Biological responses to materials. Annu Rev Mater Res 2001; 31: 81-110.
125. Ignjatovic N, Uskokovic D. Synthesis and application of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterial. Applied Surface Science. 2004; 9 (1):19-25.

126. Furukawa T, Matsusue Y, Yasunaga T, Shikinami Y, Okuno M, Nakamura T. Biodegradation behavior of ultra-high-strength hydroxyapatite/poly (L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures. *Biomaterials*. 2000 May;21(9):889-98.
127. Gittens SA1, Uludag H. Growth factor delivery for bone tissue engineering. *J Drug Target*. 2001;9(6):407-29.
128. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science*. 1965; 150 (3698): 893-9.
129. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec;22(4):233-41.
130. Wozney JM, Wikesjö UM. BMP-2: Biology and applications in oral and maxillofacial surgery and periodontics. *Tissue Engineering.Applications in Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Second Edition. Lynch SE, Marx RE, Nevins M, Wisner-Lynch LA editors. Editorial Quintessence Books. 2008 Cap 11: 159-177.
131. Wang L1, Wang H, Xu X, Wang D, Liu H. Insulin facilitates osteoblast differentiation. *Cell Biol Int*. 2013 Nov;37(11):1157-61.
132. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 2008 Sep;39 Suppl 2:S45-57.
133. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 23;99(15):9656-61.

134. Fei Y, Gronowicz G, Hurley MM. Fibroblast growth factor-2, bone homeostasis and fracture repair. *Curr Pharm Des.* 2013;19(19): 3354-63.
135. Bostrom MP, Asnis P. Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct;(355 Suppl):S124-31
136. Rasubala L, Yoshikawa H, Nagata K, Ijima T, Ohishi M. Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2003, 41(3): 173-8.
137. Marx RE. Use of PRP in oral and maxillofacial surgery and periodontology. *Tissue Engineering. Applications in Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontics.* 2º ed. Lynch SE, Marx RE, Nevins M, Wisner-Lynch LA editors. Editorial Quintessence Books. 2008 Cap 9: 132-144.
138. Baumans,V. The welfare of laboratory mice. En: Kaliste,E,editora. *The welfare of Laboratory Animals.*Dordrecht: Springer; 2007. p. 119-52. 2007.
139. The Jackson Laboratory [Página principal en internet]. Maine; c2013 [actualizado 30 Jun 2013; citado 30 Jun 2013]. Mouse Phenome Database. Phenotype data > NOD.CB17-Prkdcscid/J strain [4 pantallas]. Disponible en: <http://phenome.jax.org/>
140. Lloyd and Wolfensohn (1998) Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research.In: *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research Proceedings of the International Conference,22-25 November 1998, Zeist, The*

- Netherlands. (Hendricksen C.F.M. and Morton D.S. eds).
London UK: Royal Society of Medicine Press, pp.48-53. 1998.
141. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Cuyo [Página principal en internet]. Washington DC: Institute of Laboratory Animal Resources Edición Mexicana; c1996 [actualizado 29 Jun 2013; citado 29 Jun 2013]. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio; [3 pantallas]. Disponible en: <http://www.fcm.uncu.edu.ar/joomla/>. 2013.
142. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(4):313-9.
143. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ et al. Multilineage cells from human bone marrow: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
144. Halme DG, Kessler DA. FDA regulation of stem-cell-based therapies. *N Engl J Med*. 2006; 355(16):1730-5.
145. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials*. 2008; 29: 3053-61
146. D'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A y cols. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater*. 2009; 18: 75-83.
147. Zou D, Guo L, Lu J, Zhang X, Wei J, Liu C, Zhang Z, Jiang X. Engineering of bone using porous calcium phosphate cement and bone marrow stromal cells for maxillary sinus

- augmentation with simultaneous implant placement in goats. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18(13-14): 1464-78.
148. Riecke B, Heiland M, Hothan A, Morlock M, Amling M, Blake FA. Primary implant stability after maxillary sinus augmentation with autogenous mesenchymal stem cells: a biomechanical evaluation in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2011; 22(11): 1242-6.
149. Rickert D, Sauerbier S, Nagursky H, Menne D, Vissink A, Raghoobar GM. Maxillary sinus floor elevation with bovine bone mineral combined with either autogenous bone or autogenous stem cells: a prospective randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2011; 22 (3): 251-8.
150. 150 Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 106 (2): 203-9.
151. Mendonça JJ, Juiz-Lopez P. Regenerative facial reconstruction of terminal stage osteoradionecrosis and other advanced craniofacial diseases with adult cultured stem and progenitor cells. *Plastic and reconstructive surgery*. 2010; 126 (5) :1699-709.
152. Gonzálvez-García M, Rodríguez-Lozano FJ, Villanueva V, Segarra-Fenoll D, Rodríguez-González MA, Oñate-Sánchez R, Blanquer M, Moraleda JM. Cell therapy in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Craniofac Surg*. 2013; 24 (3): 226-8.

153. González-García M, Rodríguez-Lozano FJ, Villanueva V, Segarra-Fenoll D, Rodríguez-González MA, Oñate-Sánchez R, Blanquer M, Meseguer-Olmo L, Moraleda JM. Mesenchymal stem cells and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: the future? *Oral Dis*. 2012; 18 (8): 823-4.
154. Nam S, Nho Y, Hong S, Chae G, Jang H, Suh T, Ahn W, Ryu K, Chun H. Evaluations of poly (vinyl alcohol)/ alginate hydrogels cross-linked by γ -ray irradiation technique. *Macromolecular Research*. 2004; 12 (2): 219–224.
155. Muramatsu K, Oba K, Mukai D, Hasegawa K, Masuda S, Yoshihara Y. Subacute systemic toxicity assessment of beta-tricalcium phosphate/carboxymethyl-chitin composite implanted in rat femur. *J Mater Sci Mater Med*. 2007; 18 (3): 513-22.
156. Young CS, Bradica G, Hart CE, Karunanidhi A, Street RM, Schutte L, Hollinger JO. Preclinical Toxicology Studies of Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor-BB Either Alone or in Combination with Beta-Tricalcium Phosphate and Type I Collagen. *J Tissue Eng*. 2011; 2010: 246215.
157. Tolar J, O'shaughnessy MJ, Panoskaltsis-Mortari A, McElmurry RT, Bell S, Riddle M, McIvor RS, Yant SR, Kay MA, Krause D, Verfaillie CM, Blazar BR. Host factors that impact the biodistribution and persistence of multipotent adult progenitor cells. *Blood*. 2006; 107 (10): 4182-8.
158. Cabañas V. Transplante de células mesenquimales fucosiladas en el tratamiento de la Osteoporosis. Estudio preclínico y prueba de

- concepto. Tesis doctoral. Murcia: Servicio de publicaciones, Universidad de Murcia: 2014.
159. Toupet K, Maumus M, Peyrafitte JA, Bourin P, van Lent PL, Ferreira R, Orsetti B, Pirot N, Casteilla L, Jorgensen C, Noël D. Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice. *Arthritis Rheum.* 2013; 65 (7): 1786-94.
160. Chai YC, Roberts SJ, Desmet E, Kerckhofs G, van Gastel N, Geris L, Carmeliet G, Schrooten J, Luyten FP. Mechanisms of ectopic bone formation by human osteoprogenitor cells on CaP biomaterial carriers. *Biomaterials.* 2012; 33 (11): 3127-42.
161. Tortelli F, Tasso R, Loiacono F, Cancedda R. The development of tissue-engineered bone of different origin through endochondral and intramembranous ossification following the implantation of mesenchymal stem cells and osteoblasts in a murine model. *Biomaterials.* 2010; 31 (2): 242-9.
162. Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T (2002). Promotion of bone formation using highly pure porous beta-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 23: 4493–4502.
163. Ye X, Yin X, Yang D, Tan J, Liu G. Ectopic bone regeneration by human bone marrow mononucleated cells, undifferentiated and osteogenically differentiated bone marrow mesenchymal stem cells in beta-tricalcium phosphate scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012; 18 (7): 545-56.

164. Shamsul BS, Tan KK, Chen HC, Aminuddin BS, Ruszymah BH. Posterolateral spinal fusion with osteogenesis induced BMSC seeded TCP/HA in a sheep model. *Tissue Cell*. 2014; 46 (2): 152-8.
165. Ma J, Yang F, Both SK, Prins HJ, Helder MN, Pan J, Cui FZ, Jansen JA, van den Beucken JJ. Bone forming capacity of cell- and growth factor-based constructs at different ectopic implantation sites. *J Biomed Mater Res A*. 2014.
166. Tang M, Chen W, Liu J, Weir MD, Cheng L, Xu H. Human induced pluripotent stem cell-derived MSC seeding on calcium phosphate scaffold for bone regeneration. *Tissue engineering. Part A*. 2014; 20 (7-8): 1295-305.
167. Hughes FJ, Collyer J, Stanfield M, Goodman SA. The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro. *Endocrinology*. 1995; 136(6) :2671-7.
168. De Aza PN, García-Bernal D, Cragolini F, Velasquez P, Meseguer-Olmo L. The effects of $\text{Ca}_2\text{SiO}_4\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ceramics on adult human mesenchymal stem cell viability, adhesion, proliferation, differentiation and function. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013; 33 (7): 4009-20.
169. Toth JM, Lynch KL, Hackbarth DA. Ceramic-induced osteogenesis following subcutaneous implantation of calcium phosphates. In: Ducheyne P, Christiansen O (eds): *Bioceramics 6*. Oxford, Butterworth-Heinemann, 1993: 9-14.

170. Marx RE. Reconstruction of defects caused by bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67 (5 Suppl): 107-19.
171. Xie F1, Teng L, Wang Q, Sun XJ, Cai L, Zeng HF, Xiao R. Ectopic osteogenesis of allogeneic bone mesenchymal stem cells loading on β -tricalcium phosphate in canines. *Plast Reconstr Surg*. 2014; 133 (2): 142e-53e.
172. Yang Z, Yuan H, Tong W, Zou P, Chen W, Zhang X. Osteogenesis in extraskelately implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials*. 1996; 17 (22): 2131-37.
173. Moreau JL, Xu HH. Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation on an injectable calcium phosphate-chitosan composite scaffold. *Biomaterials*. 2009; 30 (14): 2675-82.
174. Meseguer-Olmo L, Aznar-Cervantes S, Mazón P, De Aza PN. "In vitro" behaviour of adult mesenchymal stem cells of human bone marrow origin seeded on a novel bioactive ceramics in the $\text{Ca}_2\text{SiO}_4\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system. *J Mater Sci Mater Med*. 2012; 23 (12): 3003-14.
175. Graziano A, d'Aquino R, Cusella-De Angelis MG, De Francesco F, Giordano A, Laino G et al. Scaffold's surface geometry significantly affects human stem cell bone tissue engineering. *J Cell Physiol* 2008; 214 (1):166-72.
176. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A, Giardino R et al. Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone

formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. J Oral Maxillofac Surg 2009; 67 (2): 265-72.

177. Abukawa H, Zhang W, Young CS, Asrican R, Vacanti JP, Kaban LB
Reconstructing mandibular defects using autologous tissue-engineered tooth and bone constructs. J Oral Maxillofac Surg 2009; 67 (2): 335-47.

**Estudio sobre la seguridad del constructo de células
mesenquimales, fosfato tricálcico y matriz ósea
desmineralizada para uso clínico.**

Anexos.

Anexo 1

Dictamen Evaluación Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del HCUVA.



Arrixaca
Hospital Universitario
"Virgen de la Arrixaca"

Ctra. Madrid - Cartagena • Telf. 968 36 95 00
30120 El Palmar (Murcia)

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 24/11/2014, acta 11/14 ha evaluado la propuesta del promotor para que se realice la modificación **Enmienda Relevante** en el estudio:

Título: Ensayo clínico en fase I de utilización de células mesenquimales de médula ósea autólogas sembradas sobre matriz porosa de fosfato tricálcico y matriz ósea desmineralizada en pacientes con osteonecrosis mandibular

Código Promotor: MSC/ONM **Nº EUDRACT:** 2012-005813-38

Promotor: Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia

Versión Protocolo Evaluada: 2.0 18/09/14

Versión Hoja Información al Paciente Evaluada: GENERAL / 2.0 18/09/14

2º. La modificación **Enmienda Relevante**, de tipo **Relevante**, con fecha de registro **13/11/2014** solicita:

Mod. Documentación: Protocolo	
Mod. Documentación: Hoja Información Paciente (HIP)	
Versión protocolo	2.0 18/09/14
Versión HIP	GENERAL / 2.0 18/09/14

3º. Considera que

- El ensayo se plantea siguiendo los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero y las normas que lo desarrollan, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

4º. Por lo que este CEIC emite un **DICTAMEN FAVORABLE A LA MODIFICACIÓN** y acepta que sea realizada por el **Dr. Víctor Villanueva San Vicente** como investigador principal en el *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca*.

Lo que firmo en Murcia, a 24 de noviembre de 2014

Fdo:

Servicio Murciano de Salud
Hospital "Virgen de la Arrixaca"
Comite Etico de Investigación Clínica
MURCIA

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA QUE:

1º. En la reunión celebrada el día 24 de noviembre de 2014, acta 11/14, se decidió emitir el informe correspondiente al estudio:

Título: Ensayo clínico en fase I de utilización de células mesenquimales de médula ósea autólogas sembradas sobre matriz porosa de fosfato tricálcico y matriz ósea desmineralizada en pacientes con osteonecrosis mandibular

Código Promotor: MSC/ONM **Nº EUDRACT:** 2012-005813-38

Promotor: Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia

2º. En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente - Real Decreto 223/2004 - para que la decisión del citado CEIC sea válida.

3º. El CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca, tanto en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95).

4º. El CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca a fecha 24 de noviembre de 2014 estaba compuesto por:

- Presidente **Dr. D. Antonio Piñero Madrona**
Esp. Cirugía General y del Aparato Digestivo
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vicepresidente **Dr. Luis García-Marcos Álvarez**
Esp. Pediatría y sus Áreas específicas
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Secretario **D. Pablo Viguera Paredes**
Ldo. Derecho
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dr. José María Arribas Leal**
Esp. Cirugía Cardiovascular
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dra. Dña Mª Dolores Cárcelos Barón**
Esp. Anestesiología y Reanimación
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dra. Mª del Mar Galindo Rueda**
Farmacia
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dña. Rosario García Gómez**
Otras No Sanitarias
Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia
- Vocal **Dr. D. Jesús Hernández Cascales**
Esp. Farmacología Clínica
Facultad de Medicina - Universidad de Murcia



Arrixaca

Hospital Universitario
"Virgen de la Arrixaca"

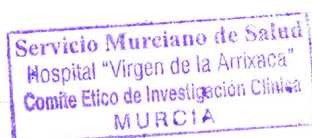
Ctra. Madrid - Cartagena - Telf. 968 36 95 00
30120 El Palmar (Murcia)

- Vocal **Dr. Carlos Marras Fernández-Cid**
Esp. Reumatología
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dra. Laura Martínez Alarcón**
Enfermería
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dr. Miguel Marín Vera**
Esp. Oncología Médica
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dr. Anibal Nieto Díaz**
Esp. Obstetricia y Ginecología
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dra. Ana Pareja Rodríguez de Vera**
Farmacia
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dr. Eduardo Pinar Bermúdez**
Esp. Cardiología
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dña Guadalupe Ruiz Merino**
Otras No Sanitarias
Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia
- Vocal **Dr. Andrés Sánchez Salinas**
Esp. Hematología y Hemoterapia
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dr. Manuel Sánchez-Solís de Querol**
Esp. Pediatría y sus Areas específicas
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dña M^a Carmen Travel García**
Administrativo
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Vocal **Dra Irene Villegas Martínez**
Esp. Neurología
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor,

Murcia, a 24 de noviembre de 2014

Fdo:



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca

Anexo 2

Consentimiento informado para la donación de muestras biológicas.

DOCUMENTOS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA ESTUDIOS GENÉTICOS Y DE INVESTIGACIÓN.

Nº HISTORIA

Don/Doña de años de edad.
(Nombre y dos apellidos del paciente)

con domicilio en y D.N.I. nº

Don/Doña de años de edad.
(Nombre y dos apellidos)

con domicilio en y D.N.I. nº

en calidad de de
(Representante legal, familiar o allegado) (Nombre y dos apellidos del paciente)

DECLARO

Que el DOCTOR/

A
(Nombre y dos apellidos del facultativo que facilita la información)

me ha informado del procedimiento relativo a la DONACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE, TEJIDOS Y/O CÉLULAS PARA UTILIZARLOS CON FINES DE INVESTIGACIÓN.

Me ha explicado que la investigación científica requiere hoy día obtener el mayor número posible de muestras de sangre, tejidos, células y/o fluidos procedentes de donantes sanos y personas que padecen ciertas enfermedades, con objeto de estudiar en ellas determinadas variantes genéticas así como otras características biológicas específicas. El estudio en profundidad de estas muestras biológicas puede ser beneficioso para los pacientes donantes de las mismas y para sus familiares por generar datos directamente relacionados con su salud. Además, este tipo de investigación es de un gran valor para la sociedad, por permitir el avance de la Medicina y lograr con ello una mayor prevención y curación de las enfermedades en el futuro.

Se me ha informado que la finalidad de este procedimiento es recoger, procesar y almacenar una o varias muestras biológicas, de entre aquellas que se obtendrán mediante los procedimientos diagnósticos y terapéuticos del manejo médico habitual de mi enfermedad. La donación de estas muestras es totalmente altruista, ha sido autorizada en su protocolo por el comité ético correspondiente y no supone ningún riesgo especial añadido para mi salud. Una vez extraídas mis muestras, éstas serán registradas y almacenadas en el Biobanco de Tumores de....., Allí todas las muestras indicadas serán procesadas para realizar diversos estudios genéticos y celulares, pudiendo incluir la experimentación con modelos animales de enfermedad, bien al momento, o bien en el futuro, en cuyo caso serán conservadas durante el tiempo que la ley determine.

¿CÓMO SE ESCOGEN LOS DONANTES?

Se les propone donar una muestra de médula ósea de 10-20 ml a pacientes de traumatología que vayan a ser intervenidos quirúrgicamente bajo anestesia general o raquianestesia, de forma que la obtención de médula no les supone ningún dolor ni interfiere con el manejo habitual de su patología quirúrgica. Se seleccionarán pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 18-85 años, con serología viral negativa y sin enfermedad infecciosa ni neoplásica activa. La obtención de la muestra sólo se realizará si las condiciones de trabajo en quirófano lo permiten.

DOCUMENTOS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

¿CÓMO SE REALIZA LA EXTRACCIÓN DE MÉDULA ÓSEA?

La extracción se realizará en el quirófano de traumatología, una vez anestesiado el paciente y preferentemente antes de la intervención quirúrgica, si las condiciones de quirófano lo permiten. La extracción será realizada por hematólogos de la Unidad de Terapia Celular o por el propio traumatólogo que realiza la intervención, mediante una punción de la cresta ilíaca (hueso de la pelvis), totalmente indolora para el paciente anestesiado. La cantidad de médula ósea que se extrae será de 10-20 ml. Los riesgos que comporta la extracción son muy pequeños, menos del 0.5 por 100 y podrían incluir aparición de un pequeño hematoma en el sitio de punción, posibilidad de infección en el sitio de punción y raramente la lesión de algún tejido local. El organismo no advierte ningún síntoma por la carencia de esta médula, que se recupera inmediatamente. No es necesario tomar ninguna medida adicional en el tratamiento excepto el que le prescriba el traumatólogo por su patología de base.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Me han informado que las muestras serán registradas de forma privada y anónima, y sólo podrán correlacionarse con cada paciente mediante unos códigos confidenciales, que tan sólo conocerá el personal autorizado, responsable del fichero. De esta manera queda garantizada la privacidad y confidencialidad de mis datos, obtenidos a raíz de las investigaciones realizadas, de acuerdo con la legislación vigente.

Asimismo, se me ha advertido que es posible que se obtenga información de especial relevancia para mi salud y la de mis familiares, en cuyo caso seré debidamente informado y asistido en el debido consejo genético, salvo que exprese mi preferencia contraria a dicha comunicación.

En el caso de que la información sea relevante para mis familiares, se me ha indicado la necesidad de informar a estos y la conveniencia de transmitirles yo personalmente dicha información.

También se me ha comunicado el derecho que me asiste a conocer los resultados que se obtengan a partir de los análisis de las muestras donadas, en el momento en que lo solicite, incluso aunque no fueran relevantes para mi salud o el tratamiento de mi enfermedad.

Me ha informado asimismo de que las muestras biológicas almacenadas no serán cedidas o distribuidas a terceros con fines comerciales o distintos a los que expresamente quedan autorizados por medio de este consentimiento, tal y como la ley establece.

Las muestras sólo podrán ser cedidas a grupos cooperativos de investigación científica u otros biobancos siempre que se cumplan los requisitos de confidencialidad que marca la legislación vigente en materia de investigación biomédica y protección de datos personales, de manera que se mantenga su anonimato y no sea, por tanto, posible mi identificación personal.

También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto y sin que eso pudiera repercutir bajo ningún concepto en la asistencia sanitaria que deba recibir. He comprendido las explicaciones que me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo y el facultativo que me ha atendido me ha dado la oportunidad de formular todas las observaciones que he considerado oportunas, y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho/a con la información recibida y que comprendo adecuadamente el alcance de la donación de muestras biológicas objeto de este consentimiento.

En vista de lo cual...

CONSENTIMIENTO

En DONAR MUESTRAS DE MI SANGRE, TEJIDOS, FLUÍDOS Y/O CÉLULAS PARA UTILIZARLOS CON FINES DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA.

Fdo: El/la Médico

Fdo: El Paciente

Fdo: El representante legal,
familiar o allegado

REVOCACIÓN

Don/Doña de años de edad.
(Nombre y dos apellidos del paciente)

con domicilio en y D.N.I. nº

Don/Doña de años de edad
(Nombre y dos apellidos)

con domicilio en y D.N.I. nº

en calidad de de
(Representante legal, familiar o allegado) (Nombre y dos apellidos del paciente)

REVOCO el consentimiento prestado en fecha, y no deseo proseguir el tratamiento, que doy con esta fecha por finalizado.

En.....(Lugar y fecha)

Fdo: El/la Médico

Fdo: El Paciente

Fdo: El representante legal,
familiar o allegado

Anexo 3

Dictamen Evaluación Comité de Ética de Experimentación Animal del HCUVA.



El Comité Ético de Experimentación Animal (CEEa) del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

1º Que una vez recibida la documentación del investigador **D. Víctor Villanueva San Vicente**, ha evaluado la propuesta referida al proyecto: *“Utilización de células mesenquimales de médula ósea humanas sembradas sobre matriz porosa de fosfato tricálcico y matriz ósea desmineralizada en ratones NOD/ SCID”* con código **101212/1/AEMPS**.

2º Que considera que el proyecto presentado respeta los principios éticos básicos recogidos en la legislación actual vigente* sobre protección de animales utilizados en investigación y otros fines científicos.

3º Por lo que emite un **INFORME FAVORABLE**

Lo que firma en Murcia a 10 de Diciembre de 2012.

Dña. Olga Mª Fernández Rodríguez.
Secretaria del CEEA.
Asesor en Salud y Bienestar Animal, Categoría D-FELASA.

*RD 1201/2005 de 10 de Octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, Ley 32/2007 para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, y Recomendaciones de la Comisión sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, 2007/526/CE.

Anexo 4

Hoja de recogida de datos.

Etiqueta/Código Biobanco

DATOS DE RECEPCIÓN

ID Ratón:	PESO
SEXO	SCORE (ANEXO)

CIRUGÍA

DÍA DE CIRUGÍA	PESO PREVIO
MSC+FTC+MOD	SCORE PREVIO
SSF 0,9%+FTC+MOD	CIRUGÍA COMPLICACIONES
DONANTE	DÍA DE SACRIFICIO

PESO

24 HORAS	5 SEMANAS
48 HORAS	7 SEMANAS
1 SEMANA	9 SEMANAS
2 SEMANAS	12 SEMANAS

SCORE TOXICIDAD AGUDA (ANEXO)

5 MIN	2 HORAS
10 MIN	24 HORAS
1 HORA	48 HORAS

SCORE TOXICIDAD CRÓNICA (ANEXO)

1 SEMANA	7 SEMANAS
2 SEMANAS	9 SEMANAS
5 SEMANAS	12 SEMANAS

MUESTRAS OBTENIDAS HISTOLOGÍA / ALTERACIONES

CORAZÓN	RIÑÓN
PULMÓN	GÓNADA
HÍGADO	CEREBRO
BAZO	SANGRE PERIFÉRICA
MÉDULA ÓSEA	CALOTA
CONSTRUCTO SC	CONSTRUCTO IM

ANÁLISIS BIOQUÍMICO**ANÁLISIS HEMATOLÓGICO**

Glucosa	Hb
Urea	Plaquetas
Creatinina	Leucocitos
GOT	Neutrófilos
GPT	Linfocitos
Calcio	Monocitos
Fósforo	Eosinófilos
Índice Hemólisis	Basófilos

MUESTRAS OBTENIDAS PCR-RT

CORAZÓN	RIÑÓN
PULMÓN	GÓNADA
HÍGADO	CEREBRO
BAZO	SANGRE PERIFÉRICA

COMENTARIOS:

Anexo 5

Protocolo normalizado de trabajo del día del sacrificio de los ratones NOD/SCID.

1. Se ha de imprimir hoja de trabajo del día, se cogen las fichas identificativas de los ratones y las solicitudes de servicios del biobanco (una por cada animal).
2. Colocación de vestuario adecuado para el trabajo con los ratones NOD/SCID (calzas, bata estéril, guantes y mascarilla) para entrar a la zona del animalario con los racks.
3. Lo primero que se ha de realizar es limpiar con alcohol 70° y conectar la campana de flujo laminar y encender las luces de la misma. Esperar durante 20 minutos a la correcta ventilación de la misma.
4. Se han de coger las jaulas con los ratones NOD/SCID que van a ser sacrificados y llevarlos a la sección de Cirugía Experimental del HCUVA en coche con acompañante.
5. También hay que llevar preparado:
 - a. OCT (para conservación de los órganos una vez extraídos)
 - b. Cazoletas para la inmersión.
 - c. 1 Eppendorf.
 - d. Caja de corcho con hielo seco.
 - e. Ficha de los animales a sacrificar.
 - f. Filtros para médula.
 - g. Placa de Petri
 - h. PBS.
 - i. Tubos microvete seco y con EDTA.
 - j. SSF 0,9%.
6. Una vez allí, se procederá al sacrificio de los animales en cámara rica de CO₂.
7. Se rotularán las cazoletas identificativas (rotulador permanente) y los cassetes (Histología) con el código correspondiente del biobanco, añadiéndole al final un guión y un número del 1 al 10 para distinguir los órganos. Las cazoletas se depositarán sobre el hielo seco de la caja de corcho. El mismo órgano SIEMPRE tendrá el mismo número. A continuación se detalla:
 - a. N° 1: Corazón.
 - b. N°2: Pulmón.

- c. N°3: Hígado.
 - d. N°4: Bazo.
 - e. N°5: Riñón.
 - f. N°6: Gónada.
 - g. N°7: Cerebro.
 - h. N°8: Médula ósea.
 - i. N°9: Calota
8. Al mismo tiempo se rotularán 2 tubos microvette secos con el ID del ratón y 2 tubo microvette con EDTA (tapón rojo) para depositar en ellos la sangre intracardiaca para la realización de la PCR-RT en sangre y los análisis bioquímico-hematológicos.
 9. Tras el sacrificio de los animales y previa a la disección se procederá a la identificación del ratón y colocación de su ficha en la mesa. Se apuntará el código de biobanco en la ficha identificativa de cada ratón.
 10. Rellenar la solicitud del biobanco una vez hemos apuntado el código en la ficha del ratón.
 11. Comienzo de la disección del animal, empezando en primer lugar por extracción de la sangre intracardiaca por aguja. La sangre recolectada se depositará en los tubos de análisis del siguiente modo:
 - a. Primero: Tubo EDTA
 - b. Segundo: Tubo Seco.
 - c. Tercero: Tubo EDTA.
 - d. Cuarto: Tubo Seco.
 12. De un tubo de EDTA se cogerán 20 uL de sangre y se echarán en un eppendorf de 1,5 mL y se le añadirán 180 uL de SSD (dilución 1:10), y se llevará a Hematimetría para la realización del hemograma.
 13. El otro tubo de EDTA más lo que quede del anterior si es que hay 2, se llevará la biobanco para su procesado.
 14. Los tubos secos se centrifugaran para la obtención del suero y se almacenarán en cámara de -80° hasta su análisis.
 15. Descripción macroscópica de los órganos y extracción.
 16. Al extraer cada uno de los órganos del 1 al 9 excluyendo el 8, se dividirá con bisturí en dos mitades. Una de las mitades se colocará en el cassette identificado con su número correspondiente con formol para la realización de la histología y la otra mitad se depositará en la cazoleta que se encuentra en el hielo seco. A ésta se le añadirá inmediatamente el OCT cubriendo el órgano por completo. Procedimiento para extracción de MO:
 - a. Colocar fémur o tibia en placa de Petri con PBS.
 - b. Cortar fémur o tibia por los dos lados con corte transversal.

- c. Introducir por uno de los extremos del fragmento resultante una aguja de 25G conectada a una jeringa con SSF 0,9% y se perfunde el hueso. De esta forma la MO saldrá por el otro extremo. El material que sale debemos cargarlos y soltarlo varias veces con la jeringa.
 - d. Tras cargar el material, lo pasamos por filtro para que retenga los segmentos óseos en una nueva placa de Petri con PBS.
 - e. Volvemos a cargar el material y lo vertemos en un ependoff. Este se mantendrá en un frigorífico a 4° mientras finaliza el procedimiento.
 - f. Cada vez que recojamos cada muestra (órgano,sangre....) se pondrá una marca en la ficha identificativa del ratón.
17. Cuando tengamos todas las muestras, los cassettes para su análisis histológico e inmunohistoquímico se llevan a Anatomía Patológica y la caja de corcho con cazoletas debidamente marcadas junto con la petición de solicitud del Biobanco se llevan a Biobanco.

Anexo 6

Petición de servicios Biobanco.



BIOBANC-MUR (Nodo 1)
Biobanco en Red de la Región de Murcia



Solicitud de Servicios

Peticionario: MAR GONZALVEZ GARCIA	A rellenar Biobanco	A rellenar Biobanco
	Nº Solicitud	Petición Servicio
Unidad/Servicio/Departamento: CIRUGIA MAXILOFACIAL-HEMATOLOGÍA		PV.....
Fecha:	BM.....	PC.....
		PCU.....

Tipo de Muestra:	☐ Derivado Hemático	☐ Tejido	☐ Fresco	☐ Otros.....
			☐ Parafinado	

☒ Técnicas de Biología Molecular

Obtención de Ácidos Nucleicos	Nº	Control de calidad de Ácidos Nucleicos	Nº	Estudios de Metilación	Nº
☐ ADN		☐ Concentración y Pureza (TECAM)		☐ Tratamiento con Bisulfito	
☐ ARN		☐ Integridad (Electroforesis)		☐ PCR	
☐ ADN complementario		☐ Funcionalidad (PCR)		☐ Pirosecuenciación	
PCR	Nº	Pirosecuenciación	Nº	Otras técnicas	Nº
☐ QPCR		☐ Detección de mutaciones			
☐ PCR a tiempo final		☐ Secuenciación de SNPs			

☒ Técnicas en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica (HUVA)

Proceso de Tejidos	Nº	Técnicas	Nº	Técnicas	Nº
☐ Inclusión en Parafina		☐ Histoquímica		☐ FISH	
☐ Formación de Bloques		☐ Inmunohistoquímica		☐ Hibridación in situ	
☐ Cortes Histológicos		☐		☐	

* Para más información contactar con Biobanc-Mur Nodo 1

Comentarios

1 CORAZON CASSETTE + CRIOMOLDE	7 CEREBRO CASSETTE + CRIOMOLDE
2 PULMON CASSETTE + CRIOMOLDE	8 CALOTA CASSETTE
3 HIGADO CASSETTE + CRIOMOLDE	9 CONSTRUCTO SC CASSETTE
4 BAZO CASSETTE + CRIOMOLDE	10 CONSTRUCTO IM CASSETTE
5 RINON CASSETTE + CRIOMOLDE	11 MO PELLET EN MICROTUBO 1,5
6 GONADA CASSETTE + CRIOMOLDE	12 SP TUBO 150 EXTRAER ARN-cDNA

Hospital General Universitario Virgen de la Arrixaca
Ctra. Madrid a Cartagena s/n 30120 El Palmar (Murcia) Tel. 968381287 Fax. 968381289 Email: biobanco@ffis.es

Anexo 7

Protocolo normalizado de trabajo de evaluación clínica de los ratones NOD/SCID.

1. Imprimir hoja de trabajo del día, coger las hojas de recogida de datos de todos los ratones del estudio.
2. Colocación de vestuario adecuado para el trabajo con los ratones NOD/SCID (calzas, bata estéril, guantes y mascarilla) para entrar a la zona del animalario con los racks.
3. Lo primero que se ha de realizar es limpiar con alcohol 70° y conectar la campana de flujo laminar y encender las luces de la misma. Esperar durante 20 minutos a la correcta ventilación de la misma.
4. Coger la balanza del animalario, desinfectar con alcohol e introducir en la campana.
5. Coger las jaulas con los ratones NOD/SCID que estarán debidamente identificadas con la Id del ratón NOD/SCID, género, y día de la cirugía.
6. Introducir la jaula en la campana de flujo y coger cada ratón NOD/SCID para ser evaluado de forma independiente.
7. Colocar un vaso esterilizado sobre la balanza, tarar pulsando la tecla T y asegurar las conexiones de todos los cables. Pesar al ratón y valorar el índice de bienestar animal tal y como se describe a continuación.
8. Se procederá al examen de los mismos, comprobando los siguientes ítems para anotar el índice de bienestar animal (Anexo índice de bienestar animal):
 - Apariencia:
 - Normal
 - Pérdida de “grooming” (lavado del pelaje de la cabeza con las manos)
 - Secreciones nasales, oculares u óticas.
 - Piloerección. Animal encorvado.
 - Ojos medio cerrados.

- Comportamiento espontáneo:
 - Normal.
 - Leves cambios.
 - Disminución en movilidad y aislado, pero alerta.
 - Sin movilidad o muy inquieto. No alerta.
 - Estado de hidratación:
 - Normal.
 - Signo del pliegue +.
 - Signos clínicos:
 - Patrón y frecuencia respiratoria (FR) normal.
 - Aumento en FR.
 - Aumento en FR con respiración abdominal.
 - Descenso en FR con respiración abdominal.
 - Marcada respiración abdominal, cianosis.
 - Comportamiento provocado:
 - Normal.
 - Respuesta algo exagerada o disminuida a la estimulación.
 - Cambios moderados en comportamiento (no movilidad a la estimulación)
 - Muy débil, precomatoso.
9. Una vez identificado cada uno de los ítems, calcularemos el índice de bienestar animal y lo anotaremos en la hoja de recogida de datos del ratón.
10. Colocar la jaula en su ubicación anterior y coger la siguiente jaula.

Anexo 8

Índice de bienestar animal.

Appendix II Example of a Checklist for the Determination of Endpoints

Parameter	Animal ID	Score	Date/Time	Date/Time
Appearance	Normal	0		
	General lack of grooming	1		
	Piloerection, fresh ocular and nasal discharges	2		
	Piloerection, hunched up	3		
	Above and eyes half closed	4		
Natural behaviour	Normal	0		
	Minor changes	1		
	Less mobile and isolated, but alert	2		
	Restless or very still, not alert	3		
Hydration status	Normal	0		
	Abnormal skin pinch test	5		
Clinical signs	Normal respiratory rate and pattern	0		
	Slight changes, increased rate only	1		
	Increased rate with abdominal breathing	2		
	Decreased rate with abdominal breathing	3		
	Marked abdominal breathing and cyanosis	4		
Provoked behaviour	Normal	0		
	Minor depression or exaggerated response	1		
	Moderate change in expected behaviour	2		
	Very weak and precomatose	3		
	Total	0-19		

Several parameters of physical appearance, behaviour and physiology have been assigned ordinal scales according to severity and compiled. Various planned interventions may be performed at predetermined total scores prior to reaching the endpoint.

From: Lloyd and Wolfensohn (1998) Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research. In: *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research, Proceedings of the International Conference, 22-25 November 1998, Zeist, The Netherlands.* (Hendricksen C.F.M. and Morton D.S. eds). London UK: Royal Society of Medicine Press, pp.48-53.