



Universidad
de La Laguna



Máster en
Biomedicina

**Evaluación de la regeneración ósea en
ratones diabéticos**

**Evaluation of bone regeneration in
diabetic mice**

Trabajo de Fin de Master

Tutorizado por: Patricia García García y Ricardo Reyes Rodríguez

Grupo de investigación: Sistemas de Liberación de Fármacos

Máster en Biomedicina

2023-2024

Claudio Francisco Rodríguez Romano

La Dra. Patricia García García, y el Dr. Ricardo Reyes Rodríguez, componentes del grupo de investigación “Sistemas de Liberación de Fármacos”, adscrito a la titulación de Máster en Biomedicina por la ULL

CERTIFICAN:

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado “Evaluación de la regeneración ósea en ratones diabéticos” ha sido realizado bajo nuestra supervisión por D. Claudio Francisco Rodríguez Romano matriculado en el Máster en Biomedicina, durante el curso académico 2023-2024.
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, damos nuestro consentimiento para ser presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.
- Que se ha indicado expresamente, a través del mecanismo de entrega de la memoria TFM por sede electrónica ULL, el deseo de hacer público o no los resultados del TFM.

Para que conste, se firma el presente certificado en La Laguna a 04 de julio de 2024

Patricia García García

Ricardo Reyes Rodríguez

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 6587560 Código de verificación: b0X0AkEk

Firmado por: Patricia García García
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 04/07/2024 17:42:34

Ricardo Reyes Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

04/07/2024 17:44:20

Índice

1. Resumen	2
2. Abstract	2
3. Introducción	3
4. Hipótesis y objetivos	9
5. Materiales y métodos	9
5.1 Elaboración y caracterización del scaffold	10
5.1.1 Elaboración y caracterización de microesferas	10
5.1.2 Elaboración y caracterización de scaffold	11
5.2 Cultivo y aislamiento de EVs	11
5.2.1 Aislamiento y caracterización de EVs	12
5.2.2 Compatibilidad celular, viabilidad y adhesión	12
5.3 Ensayos <i>in vivo</i>	13
5.3.1 Modelo animal	13
5.3.2 Evaluación histológica e histomorfométrica	14
6. Análisis estadístico	16
7. Resultados	16
7.1 Caracterización de microesferas y scaffolds	16
7.2 Caracterización de las EVs	17
7.3 Evaluación histológica e histomorfométrica	17
8. Discusión	22
9. Conclusiones	25
10. Bibliografía	26

1. Resumen

La diabetes mellitus (DM) es un conjunto de trastorno metabólicos caracterizados por presentar niveles elevados de glucosa en sangre. Este desorden metabólico afecta a múltiples sistemas orgánicos, como el hueso, comprometiendo los procesos de regeneración y reparación ósea. En este trabajo, se evaluó la capacidad regenerativa de un sistema implantable conteniendo histatina-5 (Hist-5), proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) y vesículas extracelulares (EVs) aisladas de células madre mesenquimales estimuladas con BMP2, en un defecto óseo crítico de calvaria en ratones *C57BL/6 db/db*. Estos ratones mutantes son obesos y presentan DM II, un fenotipo compatible con la DM II en humanos. El sistema se caracterizó *in vitro* y se implantó en animales de ambos sexos. Tras 16 semanas de implantación, el análisis histológico e histomorfométrico mostró una capacidad de regeneración relativa en los ratones diabéticos con valores de reparación máximos en torno al 30%, no observándose diferencias entre machos y hembras. Los resultados obtenidos muestran el potencial de los sistemas implantables para mejorar la regeneración ósea en el modelo diabético. No obstante, han de optimizarse y mejorarse determinados parámetros para conseguir mejores porcentajes de regeneración.

Palabras clave: Diabetes mellitus, células madre mesenquimales, regeneración ósea, BMP2, vesículas extracelulares, histomorfometría.

2. Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic disorders characterized by elevated blood glucose levels. This metabolic disorder affects multiple organ systems, such as bone, compromising bone regeneration and repair processes. In this work, the regenerative capacity of an implantable system containing histatin-5 (Hist-5), bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and extracellular vesicles (EVs) isolated from BMP2-stimulated mesenchymal stem cells was evaluated in a critical calvarial bone defect in *C57BL/6 db/db* mice. These mutant mice are obese and exhibit DM II, a phenotype compatible with DM II in humans. The system was characterized *in vitro* and implanted in animals of both sexes. After 16 weeks of implantation, histological and histomorphometric analysis showed a relative regenerative capacity in diabetic mice with maximum repair values around 30%, with no differences observed between males and females. The results obtained show the potential of implantable systems

to improve bone regeneration in the diabetic model. However, certain parameters should be optimized and improved to achieve better regeneration percentages.

Key words: Diabetes mellitus, mesenchymal stem cells, bone regeneration, BMP2, extracellular vesicles, histomorphometry.

3. Introducción

El hueso es una variedad de tejido conjuntivo vascularizado e innervado que se caracteriza por presentar una matriz extracelular (MEC) especializada. Desde el punto de vista histológico, el tejido óseo está constituido por células especializadas, y una MEC mineralizada. Son tres los tipos celulares especializados presentes en el hueso, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos se diferencian a partir de progenitores pluripotentes, las células madre mesenquimales (MSC) presentes en la médula ósea, en respuesta a señales extracelulares, y se localizan tanto en la superficie del hueso trabecular como del hueso compacto (Ducy *et al.*, 2000). Este tipo celular es el principal encargado del proceso de osteosíntesis, transformándose en osteocito una vez queda atrapado en el interior de la MEC. Los osteocitos por su parte constituyen el tipo celular especializado característico del hueso maduro y son los encargados de mantener y regular la homeostasis ósea. El otro tipo celular especializado lo constituyen los osteoclastos, células gigantes multinucleadas pertenecientes al sistema mononuclear-fagocítico, y responsables de la resorción de la MEC mineralizada del hueso. Los osteoclastos, a diferencia de los osteoblastos, tiene un origen diferente a partir de la fusión de progenitores mononucleares de origen hematopoyético (Chambers, 2000; Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a).

La diferenciación osteoblástica está controlada por genes de la familia Hedgehog, en concreto los genes Sonic hedgehog (*Shh*) e Indian hedgehog (*Ihh*), el factor de transcripción *Cbfa1* y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), las cuales actúan favoreciendo la migración de las células osteoprogenitoras, induciendo su proliferación y diferenciación, así como la producción de MEC una vez han alcanzado el estado diferenciado (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a; Devescovi *et al.*, 2008).

La primera evidencia del proceso de diferenciación osteoblástica es la expresión del factor *Cbfa1*. Asimismo, empiezan a expresarse distintos tipos de proteínas específicas como el colágeno tipo I (Col I) y la osteopontina (OPN), marcadores tempranos de diferenciación osteogénica. También se encuentran involucrados en este

proceso la fosfatasa alcalina (ALP), proteína de superficie con funciones reguladoras de la proliferación y diferenciación osteoblástica, además de otros marcadores osteogénicos importantes como la osteocalcina (OCN) y la sialoproteínas óseas (BSPs), de gran importancia en las fases finales de la diferenciación osteoblástica (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a; Arboleya & Castañeda, 2013; Levasseur, 2019).

Desde el punto de vista fisiológico, el hueso es un tejido dinámico que mantiene en equilibrio los procesos de formación y resorción ósea (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b). El proceso de resorción ósea implica a los osteoclastos cuya función consiste en disolver la matriz mineral y descomponer la matriz orgánica u osteoide. Por otro lado, la formación ósea implica el proceso contrario, es decir, la síntesis de nueva matriz orgánica u osteoide por parte de los osteoblastos que será posteriormente mineralizada (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b; Riancho & Delgado-Calle, 2011) (Figura 1). La capacidad de regeneración del hueso es una característica propia de este tejido, en el que están involucrados diferentes procesos biológicos como la osteoinducción y la osteoconducción, entre otros, que se desarrollan de forma sincronizada. Entre los factores reguladores de la regeneración ósea, además de la participación de diferentes tipos celulares, encontramos diferentes moléculas como factores de crecimiento, hormonas y diversas citoquinas (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b; Dimitriou *et al.*, 2011).

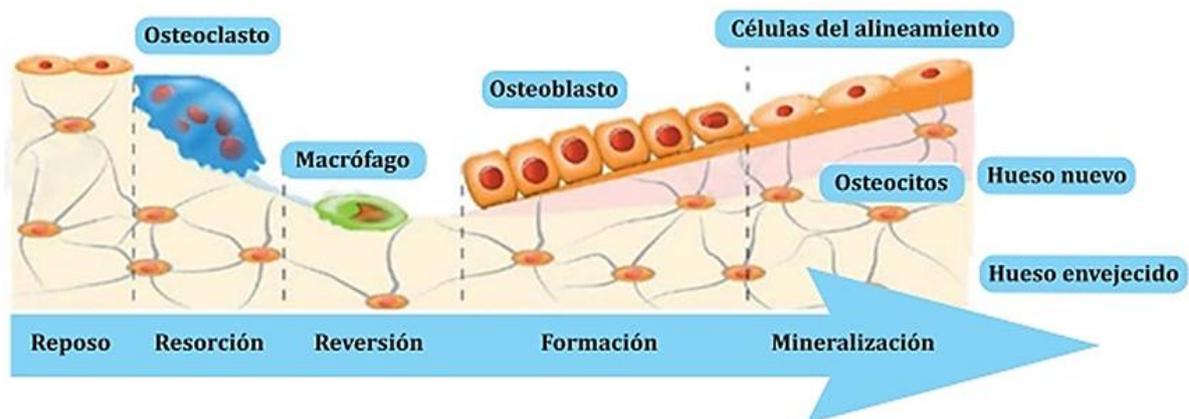


Figura 1. Esquema clásico de las estirpes celulares y fases que conforman el proceso de remodelado óseo. Modificado de Castañeda *et al.*, (2021).

La regeneración del tejido óseo es diferente a la regeneración de otros tejidos tras haber sufrido un trauma o lesión, puesto que, en las lesiones óseas, el tejido que se forma no es tejido cicatricial sino hueso, y el hueso que se forma de *ново*, se regenera con las

características del hueso preexistente. Sin embargo, existen algunas condiciones en las cuales el proceso de regeneración ósea se ve afectado o comprometido, como en la reparación de defectos o lesiones críticas causadas por traumas severos y en determinadas situaciones fisiopatológicas como la osteoporosis o la diabetes mellitus (Dimitriou *et al.*, 2011; Marin *et al.*, 2018), siendo esta última de especial relevancia por su alta prevalencia y sus complicaciones micro y macroangiopáticas que comprometen la función vascular, clave en el proceso de regeneración.

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos frecuentes que comparten el fenotipo de la hiperglucemia. De acuerdo con la causa de la DM, los factores que contribuyen a la hiperglucemia pueden ser deficiencia de la secreción de insulina, disminución de la utilización de glucosa o aumento de la producción de esta (Powers, 2015). El trastorno de la regulación metabólica que acompaña a la DM provoca alteraciones fisiopatológicas secundarias en muchos sistemas orgánicos, incluido el hueso, comprometiendo entre otros, los procesos de reparación y regeneración después de un traumatismo (Jackuliak & Payer, 2014; López-Herradón *et al.*, 2014; Marin *et al.*, 2018; Palma Peña *et al.*, 2021). Igualmente, el estado proinflamatorio y el deterioro de la vascularización en la DM impiden una correcta distribución del oxígeno y otros nutrientes causando un desequilibrio negativo en el proceso de remodelado óseo, caracterizado por un aumento de la resorción y una disminución en la formación (Marin *et al.*, 2018; Sabado-Bundo *et al.*, 2019). Además, la hiperglucemia es capaz de alterar la matriz ósea mediante la generación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) que afectan al colágeno y otras proteínas, contribuyendo a la transformación del hueso, en un hueso de calidad y resistencia inferiores (Jackuliak & Payer, 2014; Marin *et al.*, 2018). Una de las complicaciones frecuentes asociadas a la DM son las infecciones óseas (osteomielitis; OM) que afectan a la porción medular y cortical del hueso, causadas por la inoculación directa o diseminación sanguínea de microorganismos (Leotau Rodríguez & Villamizar, 2010; Ugalde Ovares & Morales Castro, 2014; Mora-Zúñiga *et al.*, 2021). En el tratamiento para reducir las infecciones óseas y mejorar la cicatrización y regeneración de los tejidos en pacientes diabéticos, se emplean péptidos como las histatinas. Estas, presentan dos efectos biológicos importantes, un efecto antimicrobiano/antifúngico y un efecto estimulante promoviendo la migración y la proliferación celular (Stallmann *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2021).

La medicina regenerativa del hueso ha experimentado en los últimos años avances significativos en la búsqueda y el desarrollo de nuevas formas y mecanismos de reemplazo óseo. Entre las numerosas innovaciones surgidas en este campo para el tratamiento de defectos óseos, el uso del injerto óseo autólogo o autoinjerto, destaca por presentar las propiedades necesarias para el correcto desarrollo del proceso de reparación; en concreto, proporciona soporte interno permitiendo así el crecimiento celular (osteoconducción), promueve a su vez la proliferación de MSC así como la diferenciación de estas hacia un fenotipo osteogénico (osteoinducción) y además, contiene células osteoprogenitoras lo que contribuye a su potencial osteogénico (Dimitriou *et al.*, 2011; Henkel *et al.*, 2013). Por otra parte, al proceder del propio paciente, este tipo de injerto elimina el problema de rechazo. Sin embargo, los autoinjertos presentan una serie de limitaciones tales como: volumen óseo disponible del paciente limitado, requerimiento de una segunda intervención que puede ocasionar molestias e incomodidades al paciente y unos costes elevados (Dimitriou *et al.*, 2011; Henkel *et al.*, 2013). Una de las alternativas existentes a los autoinjertos, son los aloinjertos procedentes de cadáveres humanos o de donantes vivos, y los xenoinjertos procedentes de especies distintas a la del receptor. Estos dos tipos de injerto tienen como ventajas la obtención de una cantidad mayor de material de injerto y la necesidad de una única intervención al paciente. Sin embargo, ambos tipos presentan como principal desventaja el riesgo de rechazo y de transmisión de patógenos, más elevado en el caso de los xenoinjertos (Roseti *et al.*, 2017; Martínez Álvarez *et al.*, 2018).

Como solución innovadora a los injertos óseos, emerge en la década de los 80 la ingeniería de tejidos. Esta rama de la medicina regenerativa emplea los principios de las ciencias aplicadas como la ingeniería y la biomedicina en el desarrollo de sustitutos biológicos capaces de inducir y conducir la regeneración de un tejido u órgano (Álvarez, 2009; Fabrès, 2010; Kim *et al.*, 2024; Zare *et al.*, 2024). La ingeniería de tejidos se fundamenta en el uso de tres pilares básicos: el uso de biomateriales para la elaboración de andamios o estructuras 3D (scaffolds), y el uso de factores de crecimiento, por un lado,

y células por otro, como principales opciones terapéuticas para facilitar y acelerar la regeneración (Figura 2).

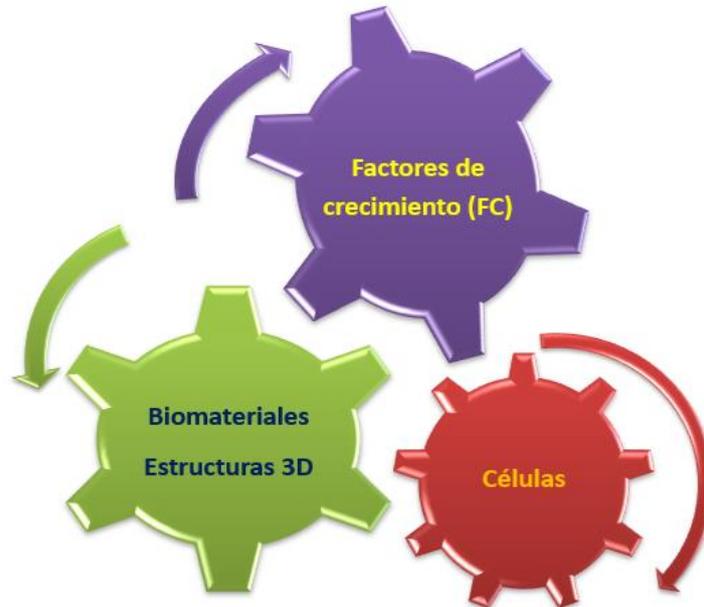


Figura 2. Elementos básicos en los que se basa la ingeniería de tejidos.

Inicialmente se hacía uso de materiales inertes óseos que tenían como función principal el andamiaje en los procesos de regeneración, pero la constante evolución de las tecnologías ha permitido el uso de nuevos biomateriales que además de cumplir con la función de soporte, sirviendo de guía al nuevo tejido en crecimiento, actúan como inductores de la regeneración ósea (Henkel *et al.*, 2013; Hernández-Évora *et al.*, 2014).

Los scaffolds juegan un papel fundamental, ya que proporcionan una estructura tridimensional similar a la matriz del hueso, que facilita la adhesión y la migración celular, y unas propiedades mecánicas y fisicoquímicas que crean el microambiente adecuado para la regeneración ósea. Los biomateriales utilizados para la elaboración de scaffolds son generalmente polímeros de origen natural o sintético biocompatibles y biodegradables. Además, se busca que tengan propiedades osteoconductoras y osteoinductoras. Por otra parte, los scaffolds deben tener una adecuada porosidad para permitir la colonización celular y el crecimiento de vasos sanguíneos en su interior (Henkel *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2019; Correa-Araujo *et al.*, 2024; Huang *et al.*, 2024).

Los polímeros de origen natural presentan una buena biocompatibilidad, buena capacidad bioactiva, osteoconductividad y una baja inmunogenicidad. Entre ellos tenemos la fibrina, el quitosano, el colágeno y el ácido hialurónico entre otros. A pesar de sus buenas propiedades biológicas, existen algunas desventajas como sus limitadas

propiedades mecánicas, variabilidad entre lotes debido a su forma de producción, y una cinética de degradación difícilmente controlable (Roseti *et al.*, 2017; Nikolova & Chavali, 2019; Zhang *et al.*, 2020).

Por otro lado, los polímeros sintéticos como el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), el ácido poliláctico (PLA) y el fumarato de polipropileno (PPF), muestran una tasa de degradación más controlada en comparación con los polímeros naturales, mayor vida útil, menores costes de producción y se pueden fabricar en grandes cantidades de manera uniforme o estandarizada. No obstante, este tipo de polímeros presentan como desventaja una menor capacidad de interacción celular (Roseti *et al.*, 2017; Nikolova & Chavali, 2019; Zhang *et al.*, 2020).

Los factores de crecimiento son un grupo de proteínas de señalización capaces de inducir una respuesta celular específica. Hay diferentes tipos de factores que promueven el crecimiento y la diferenciación del tejido óseo, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y los factores osteoinductivos más potentes, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Entre las respuestas celulares específicas que se pueden generar debido a la señalización por estos factores se incluyen: la regulación de la supervivencia celular y el reclutamiento, migración, adhesión, proliferación y diferenciación celular (Lee *et al.*, 2011; Sierra-García *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2021).

Las MSC son células pluripotentes capaces de diferenciarse en diversos linajes celulares y participar en la homeostasis del organismo mediante la renovación y regeneración de tejidos, constituyendo una herramienta de uso potencial en medicina regenerativa. Sin embargo, el uso terapéutico de MSC presenta varias desventajas, entre las que destacan la escasa homogeneidad de esta estirpe celular y la baja viabilidad de las células trasplantadas. Por esta razón, en los últimos años ha cobrado especial relevancia el uso de la fracción vesicular obtenida a partir de estas células, específicamente la fracción correspondiente a las vesículas extracelulares (EVs), ya que se ha demostrado que son las principales responsables de inducir procesos fisiológicos relacionados con la regeneración. Las EVs se utilizan como una estrategia terapéutica para promover la activación de la diferenciación osteoblástica, contribuyendo así a mejorar los procesos de regeneración ósea (Casado-Díaz *et al.*, 2023).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, el actual reto de la medicina regenerativa se centra en conseguir, intensificar y acelerar los procesos de reparación y regeneración tisular en contextos fisiopatológicos en los cuales dichos procesos se ven especialmente alterados. Por este motivo, en este trabajo planteamos el uso de la ingeniería de tejidos como estrategia terapéutica, evaluando su impacto sobre el proceso de regeneración tisular en un modelo animal que recrea un contexto fisiopatológico especialmente complejo como la DM II de larga evolución.

4. Hipótesis y objetivos

Los ratones C57BL/6 *db/db*, caracterizados por una mutación autosómica recesiva en el gen del receptor de leptina, presentan una disfunción metabólica que causa diabetes y obesidad, creando una situación fisiopatológica similar a la DM II en humanos, en la que se alteran múltiples procesos incluyendo la regeneración tisular. En esta situación, la ingeniería de tejidos podría contribuir mejorando la respuesta regenerativa y consiguiendo tasas de reparación tisular aceptables. Por ello, nos hemos planteado como **objetivo general** en este trabajo, evaluar en un defecto óseo crítico de calvaria en ratones C57BL/6 *db/db*, la capacidad regenerativa de un sistema implantable (scaffold) conteniendo histatina-5 (Hist-5), BMP2, y EVs.

Para llevar a cabo este objetivo general se han planteados los siguientes **objetivos específicos**:

- Aislamiento y caracterización de EVs a partir de MSC derivadas de médula ósea, estimuladas con BMP2.
- Elaboración, caracterización y optimización *in vitro* de un sistema implantable conteniendo microesferas de Hist-5, microesferas de BMP2 y EVs.
- Evaluación *in vivo* de la capacidad regenerativa del sistema implantable conteniendo Hist-5, BMP2 y EVs, por separado o en combinación, en ratones de ambos sexos.

5. Materiales y métodos

Para la elaboración del scaffold, microesferas, cultivo celular, aislamiento de EVs y análisis histológico se emplearon los siguientes materiales y reactivos: quitosano (CHT, 150mPa.s, Protasan® UP-CL-213, NovaMatrix, Ultrapure Polymer Systems), tripolifosfato sódico (TPP; Sigma-Aldrich). La proteína morfogenética ósea 2 (BMP2,

Biomedal Life Sciences), histatina-5 (Hist-5, secuencia N-Term a C-Term, H-DSHAKRHHGYKRKFHHSHRGY-OH, Eurogentec, USA), polialcohol vinílico (PVA, Mw 30–70 kDa, 87–90% hidrolizado, Sigma-Aldrich). El ácido poli (láctico- co -glicólico) (PLGA) PLGA 50:50 (RG504, Resomer®, 0.58 dL/g, Evonik Industries), PLGA 85:15 -RG858 (PLGA 85:15, Resomer®, 1.5 dL/g, RG858-S Evonik Industries), cloruro de metileno (DCM, Sigma-Aldrich). Los medios de cultivo utilizados fueron medio Eagle modificado de Dulbecco's (DMEM, HyClone®), suero bovino fetal (FBS, Biowest), estreptomycin/penicilina (Sigma-Aldrich), L-glutamina (Biowest), solución salina fosfatada de Dulbecco (DPBS, Lonza), tripsina (Tripsina-EDTA 0,25% en HBSS libre de calcio, magnesio y rojo fenol, Biowest), azul de tripano (Trypan blue, Sigma-Aldrich) y descalcificador histofix® (Panreac).

5.1 Elaboración y caracterización del scaffold

5.1.1 Elaboración y caracterización de microesferas

Las microesferas conteniendo BMP2 fueron preparadas por el método de doble emulsión (w/o/w) con evaporación del disolvente previamente descrito (García et al., 2020). Brevemente, se emulsionaron 200 µl de polialcohol vinílico (PVA) al 0.2 % que contenía 75 µg de BMP2 (1µg/µl) con 150 mg de PLGA 50:50 y PLGA 85:15 en 1 ml de cloruro de metileno (DCM) mediante agitación en vórtex (Genie® Industries 2, Sciences Industries Inc.) durante 1 minuto. A continuación, a la primera emulsión se le añadieron 5 ml de una disolución de PVA al 0.2%, se agitó en vórtex durante 15 segundos e inmediatamente se vertieron en 100 ml de PVA al 0.1%. Se mantuvo bajo agitación magnética en cabina de extracción durante 1 hora para la evaporación del disolvente.

Las microesferas de histatina-5 se elaboraron siguiendo el mismo protocolo que las microesferas de BMP2, pero la fase interna acuosa contenía 2 mg de Hist-5 (10 µg/µl) en lugar de 75µg de BMP2.

En ambos casos, las microesferas se lavaron con agua doblemente destilada y se recogieron por filtración utilizando filtros con un tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore Express 0.45 µm PES membrane, 47 mm.), se liofilizaron y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Las microesferas se caracterizaron en términos de distribución de tamaño en un Mastersizer (Masterziser,) y morfología mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) tras el recubrimiento con oro.

5.1.2 Elaboración y caracterización de scaffold

Se elaboraron scaffolds de quitosano (CHT) de 4 mm de diámetro. Para ello se dispersaron 12 mg de microesferas (2 mg de microesferas de BMP2 y 10 mg de microesferas de Hist-5) en 40 μ l de CHT al 2% y se liofilizaron. Posteriormente, los scaffolds se reticularon con 40 μ l de tripolifosfato sódico (TPP; Sigma-Aldrich) al 5% durante 3 minutos, se lavaron dos veces con 80 μ l de agua MilliQ y se volvieron a liofilizar. Todos los scaffolds se mantuvieron conservados a 4°C hasta su uso. Los scaffolds se caracterizaron en términos de porosidad, captación de agua y pérdida de masa. Además, se observó su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, ZEISS EVO 15, Tokio, Japón).

La porosidad se calculó haciendo uso de la siguiente ecuación (ec 1).

$$\text{Porosidad (\%)} = \left(1 - \frac{\rho_{\text{real}}}{\rho_{\text{aparente}}}\right) \times 100 \text{ (ec. 1)}$$

Donde ρ_{real} y ρ_{aparente} corresponden con las densidades reales y aparentes de los scaffolds respectivamente. La densidad real fue medida utilizando un picnómetro de helio (AccuPyc 1330 V2.04N, Micromeritics, EE. UU.) y la densidad aparente fue calculada a través de las medidas de volumen y peso de las muestras. Para calcular la pérdida de masa y captación de agua de los scaffolds, las muestras fueron incubadas en 4 ml de agua MilliQ bajo agitación orbital (25 rpm) a 37°C. A cada punto de tiempo, 6 horas, 1 día y 7 días, se retiraron 3 muestras, se secó el exceso de agua, se pesaron, se liofilizaron y se volvieron pesar para obtener el peso seco de los scaffolds. La pérdida de masa y la captación de agua se calcularon haciendo uso de las siguientes ecuaciones (ec 2 y 3).

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = \left(P_0 - \frac{P_s}{P_0}\right) \times 100 \text{ (ec. 2)}$$

$$\text{Captación de agua (\%)} = \left(P_h - \frac{P_{-s}}{P_h}\right) \times 100 \text{ (ec. 3)}$$

Donde P_0 es peso inicial, P_s es peso seco y P_h es peso húmedo.

5.2 Cultivo y aislamiento de EVs

Las MSC (C3H10T1/2, ATCC) se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, HyClone®) suplementado con suero bovino fetal (FBS, Biowest) al 10%, estreptomycin/penicilina (Sigma-Aldrich) al 1% y L-glutamina (Biowest) al 1%. Las células se cultivaron hasta un 80% de confluencia a 37°C y al 5% de CO₂. Una vez

alcanzada esta confluencia las células se estimularon con 200 ng/ml de BMP2 en el medio de cultivo suplementado durante 24 horas.

5.2.1 Aislamiento y caracterización de EVs

Pasadas 24 horas, el medio conteniendo BMP2 se eliminó y las células se lavaron dos veces con 10 ml de DPBS (DPBS, Lonza®). Para el aislamiento de las EVs se utilizó un medio libre de EVs, este medio contiene un 1% de penicilina/estreptomicina, un 1% de L-glutamina y 5% FBS libre de EVs. Este suero previamente se somete a una ultrafiltración a 3000 G durante 55 minutos haciendo uso de filtros Amicon (Ultra-15 de 10kDa, Amicon, Millipore, EEUU) a 4°C. Las células se mantienen en cultivo en este medio durante 48 horas.

Para aislar EVs el medio de cultivo se sometió a dos rondas de centrifugación consecutivas, una primera centrifugación a 2,000 g a 4 °C durante 30 minutos para eliminar células muertas, a continuación, el sobrenadante se volvió a centrifugar a 10,000 g a 4°C durante 30 minutos para eliminar restos celulares o “cell debris”. Finalmente, el sobrenadante se sometió a ultracentrifugación, 100,000 g a 4°C durante 2 horas (Ultracentrífuga Beckmann Coulter Optima L-XP Series). Tras la ultracentrifugación se retiró el sobrenadante de los tubos y se resuspendió el pellet en DPBS, utilizando 1 ml por cada 2 millones de células utilizadas para el aislamiento. Las EVs se caracterizaron en términos de tamaño y potencial zeta utilizando un Zetasizer NanoZS (Malver Instruments, Reino Unido).

5.2.2 Compatibilidad celular, viabilidad y adhesión

Para la evaluación de la viabilidad celular (12 horas) y adhesión (48 horas) se utilizaron células MSC, C3H10T1/2. Para ello se sembraron 50,000 células en 40 µl de medio suplementado sobre la superficie de los scaffolds, y se incubaron durante 1,5 horas a 37°C y 5% CO₂ para facilitar la adhesión de las células. Pasado este tiempo se adicionaron 360 µl de medio completo con 5% de FBS libre de vesículas. En aquellos grupos que se evaluó el efecto EVs aisladas de MSC estimuladas con BMP2, se adicionaron 40 µl de la suspensión EVs (2 millones células/ml) y se dejó incubar durante 30 a 37°C y 5% CO₂, antes de la siembra celular.

Pasadas 12 y 48 horas de la siembra, se realizó un ensayo de XTT (Cell Viability Kit, Cell Signaling Technology) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, cada

pocillo con scaffold se lavó 2 veces con DPBS, y se le añadieron 200 µl de medio suplementado con la mezcla de reactivos (4:1) y se incubó durante 2 horas en oscuridad. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia del sobrenadante a 445 nm utilizando un lector de placas (Biotek), utilizando como control los scaffolds de quitosano.

5.3 Ensayos *in vivo*

Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la legislación de la Unión Europea sobre Cuidado y Uso de Animales en Procedimientos Experimentales (2010/63/UE) y previa aprobación por el Comité Ético para el cuidado de animales de la Universidad de La Laguna (CEIBA2018-0310).

5.3.1 Modelo animal

En este estudio se emplearon 28 ratones *db/db* de ambos sexos de 12 semanas correspondientes a la cepa C57BL/6. Los animales se dividieron en cuatro grupos experimentales, cada uno subdividido a su vez por sexos, estos grupos están descritos en la Tabla 1.

Los ratones fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico bajo anestesia inhalatoria en el que se realizó un defecto óseo crítico de 4 mm de diámetro en la calvaria. En el mismo procedimiento, y una vez creado el defecto, se colocaron los implantes de quitosano conteniendo los distintos tratamientos (Tabla 1). Una vez implantados, se cerró la herida utilizando grapas quirúrgicas. La analgesia consistió en buprenorfina (0.02 mg/kg) administrada subcutáneamente antes de la intervención quirúrgica, como antiinflamatorio se utilizó ketoprofeno (5-10 mg/kg) vía subcutánea, y finalmente, se administró ketoprofeno en el agua de bebida durante las 72 horas posteriores a la intervención. Los animales se mantuvieron durante un periodo de 4 meses, una vez finalizado este periodo, los ratones se sacrificaron, se extrajeron las calvarias y se fijaron en formol tamponado al 4% para su posterior procesado y análisis histológico.

Tabla 1. Grupos experimentales utilizados en el ensayo *in vivo*, todos los grupos experimentales incluyen 10 mg de microesferas cargadas con Hist-5. n=7

Grupos experimentales	Tratamiento
♀/♂ CHT	Scaffold de quitosano

♀/♂ CHT + BMP2 en microesferas	Scaffold de quitosano con microesferas de BMP2
♀/♂ CHT + EVs (BMP2)	Scaffolds de quitosano y EVs aisladas de células estimuladas con BMP2
♀/♂ CHT + BMP2 en microesferas EVs (BMP2)	Scaffolds de quitosano con microesferas de BMP2 y EVs

5.3.2 Evaluación histológica e histomorfométrica

Las muestras se fijaron por inmersión en formol tamponado al 4% durante 24 horas y posteriormente se descalcificaron en una solución descalcificadora, Histofix® (Panreac). Tras la descalcificación las muestras se incluyeron en parafina (Paraplast®). Para ello, se deshidrataron en una serie de alcoholes de gradación creciente (alcohol 96° y alcohol 100°), posteriormente se diafanizaron en toluol y se incubaron en la estufa a 60° C en tres baños de parafina a diferentes tiempos; el primer baño entre 1-2 horas, el segundo entre 4-12 horas y el tercero de 24 horas. A continuación, se confeccionan los bloques mediante el uso de moldes metálicos y casetes histológicos. Los bloques se solidificaron a temperatura ambiente extrayéndose a continuación del molde. Posteriormente, se cortaron en un microtomo de rotación (Shandon Finesse 325, Thermo electron corporation) obteniendo secciones de 5 µm de grosor que se montaron en placa calefactora sobre portaobjetos adherentes (Superfrost TM Plus Adhesion Microscope Slides, Epreidia). Las muestras una vez montadas se guardaron en estufa a 37°C hasta el momento de su procesamiento.

Para el procesado, las muestras se desparafinaron e hidrataron y se realizaron las tinciones histológicas Tricrómica de Masson (Tabla 2) y Hematoxilina-VOF (Tabla 3) para identificar la neoformación ósea como así el grado de mineralización del hueso neoformado respectivamente. La técnica de VOF permite inferir el grado de mineralización en muestras descalcificadas gracias a la impronta que deja esta en la MEC del tejido óseo, lo que hace que zonas con mayor mineralización se tiñan de rojo mientras que las zonas menos mineralizadas lo hacen de azul.

Tabla 2. Protocolo empleado para la tinción Tricrómica de Masson.

Tricrómica de Masson			
Solución Bouin	Toda la noche	Ácido fosfotúngstico- Ácido fosfomol	2 minutos
Agua corriente + agua destilada	5 minutos + 1 minuto	Azul anilina	5 minutos
Hematoxilina Weigert	10 minutos	Agua destilada	1 minuto
Agua corriente + agua destilada	5 minutos + 1 minuto	Ácido acético	4 minutos
Biebrich escarlata fucsina	2 minutos	Deshidratado y montaje con Eukitt	-

Tabla 3. Protocolo empleado para la tinción Hematoxilina-VOF.

Hematoxilina - VOF			
Hematoxilina Harris	4 minutos	VOF	4 minutos
Lavado con agua corriente	5 minutos	Lavado con agua destilada	-
Agua destilada	1 minuto	Deshidratado y montaje con Eukitt	-

Las muestras procesadas fueron analizadas con un microscopio óptico (Leica DM 4000B) con cámara digital (Leica DFC300FX). Las imágenes capturadas se analizaron mediante el software (LeicaQ-winV3Pro-image analysis system). Para el análisis histomorfométrico, definimos una región de interés (ROI) consistente en un área circular de 12,5 mm², cuyo centro coincidía con el centro del defecto. Esta región cubría toda la superficie del defecto y estaba limitada por el hueso hospedador. Dentro de esta ROI, el hueso neoformado se distinguió del material, así como de otros tejidos por diferencias de estructura y coloración. La formación de hueso nuevo se expresó como porcentaje de regeneración en relación con el área total del defecto.

6. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado empleando el software SPSS 29.0. La comparación entre los distintos tratamientos se llevó a cabo mediante un análisis de la varianza unidireccional (ANOVA I) con una prueba posterior de comparación múltiple de Tukey. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con valores de $p < 0.05$. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (SD).

7. Resultados

7.1 Caracterización de microesferas y scaffolds

En este estudio se llevaron a cabo diferentes métodos de caracterización que permitieron determinar las propiedades físicas de los distintos componentes de los sistemas implantables. Las microesferas se caracterizaron en términos de tamaño en el Mastersizer, presentando un diámetro promedio de $90,825 \mu\text{m}$ (distribución del 10% $< 52,326 \mu\text{m}$, distribución del 90% $< 151,707 \mu\text{m}$). La morfología y tamaño de las microesferas, así como la estructura del sistema implantable se muestran en la (Fig. 3A-C).

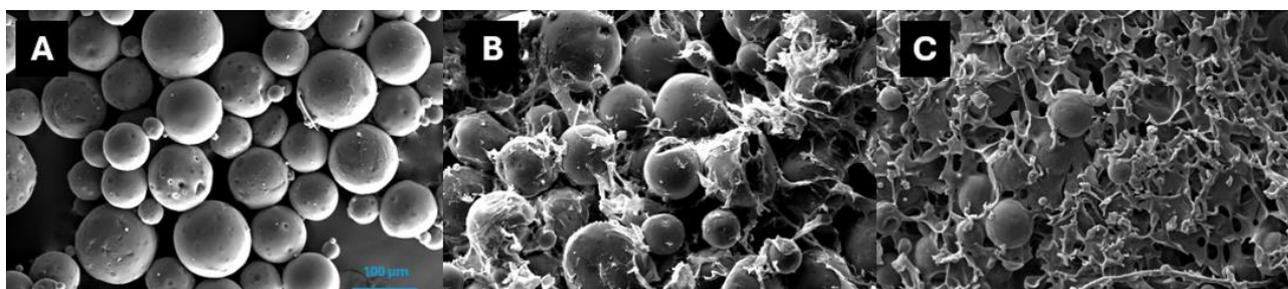


Figura 3. Imágenes de SEM de las microesferas blancas (sin BMP2 ni Hist-5) (A), superficie del sistema implantable cargado con microesferas (B) y estructura interior del sistema implantable cargado con microesferas(C). Barra de escala: $100 \mu\text{m}$.

Los scaffolds, preparados a partir de la dispersión de una mezcla de microesferas con quitosano, presentaron una porosidad del $86,58 \pm 1,28 \%$.

La incubación de los scaffolds a 37°C durante un periodo de 7 días reveló una captación de agua y pérdida de masa, como se muestra en la Figura 4. La captación de agua se ve incrementada significativamente en las primeras 6 horas, pasando del $142,76 \%$ al $177,36 \%$ de su peso original, observándose muy poca variación durante el resto del periodo de incubación. Por otro lado, los scaffolds experimentaron una pérdida de masa no superior al $9,98 \%$ durante el periodo de incubación.

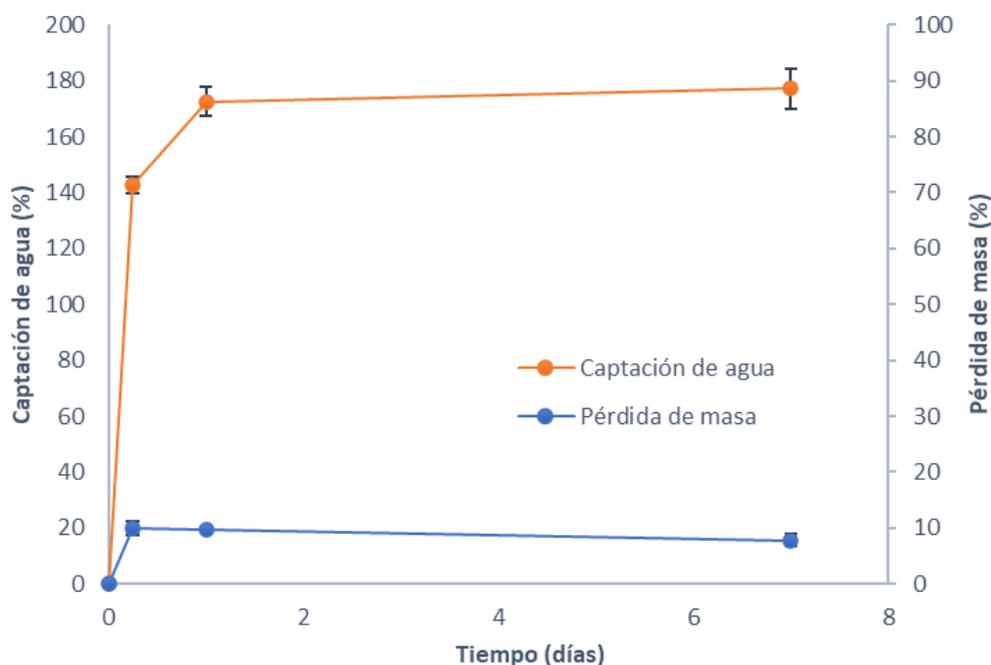


Figura 4. Captación de agua (línea naranja) y pérdida de masa (línea azul) del sistema implantable durante un periodo de incubación en agua a 37°C bajo agitación orbital suave (25 rpm).

7.2 Caracterización de las EVs

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de las EVs mostraron un tamaño medio de $251,4 \pm 57,6$ nm. Presentan a su vez un índice de polidispersión bajo, del $0,24 \pm 0,04$ y un potencial zeta del $-11,88 \pm 6,62$ mV.

Por otro lado, los resultados de los sistemas implantables en los que se evaluó el efecto de las EVs en la adhesión y proliferación celular, aisladas de MSC estimuladas con BMP2, reflejaron una adhesión del $82,571 \pm 4,532$ % y una proliferación del $112,396 \pm 0,481$ % comparado con el control de quitosano (CHT).

7.3 Evaluación histológica e histomorfométrica

El análisis histológico de las muestras a las 16 semanas postimplantación, reveló de forma general en todos los grupos experimentales, tanto en machos como en hembras, escasa reparación ósea. La formación de hueso nuevo se observó principalmente en los márgenes del defecto, observándose escasa presencia de hueso en el interior de este, salvo de manera aislada en algunos de los grupos experimentales. Concretamente, se observaron focos de osificación aislados en los grupos blanco (CHT) de ambos sexos (Fig. 5A), mientras que en otros grupos como los tratados con implantes conteniendo

BMP2, EVs o la combinación de ambos, se observó, en las hembras la presencia de un hueso de aspecto más o menos filiforme y dispuesto en láminas concéntricas (Fig. 5A), mientras que en los machos se observó la presencia de un hueso de aspecto más poroso (Fig.5A). En la mayoría de los animales, se observó la presencia de cantidades variables de tejido conjuntivo laxo en el interior del defecto rodeando al hueso neoformado (Fig. 5A).

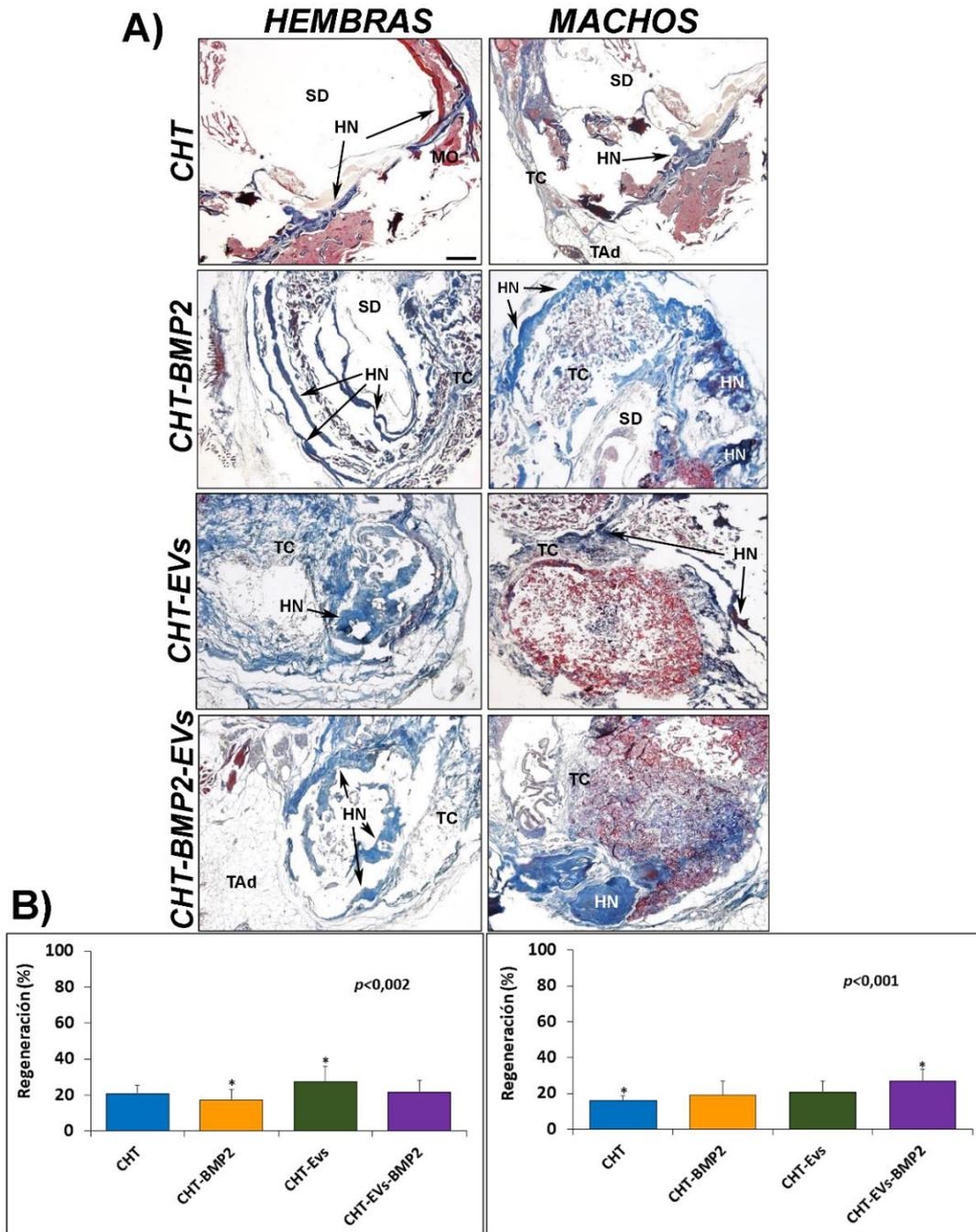


Figura 5. (A) Imágenes panorámicas representativas con la tinción de Masson que muestran la regeneración del defecto de calvaria en los diferentes grupos experimentales (CHT, CHT-BMP2,

CHT-EVs y CHT-BMP2-EVs). HN: hueso neoformado; SD: sitio defecto; TC: tejido conectivo; TAd: tejido adiposo; MO: matriz ósea. **(B)** Análisis histomorfométrico de las muestras de calvaria de los distintos grupos experimentales (CHT, CHT-BMP2, CHT-EVs y CHT-BMP2-EVs). Las barras representan medias \pm SD. El asterisco sobre diferentes histogramas indica diferencias significativas entre ellos. Barra de escala: 0,5mm.

El análisis del hueso neoformado en los márgenes del defecto, reveló la presencia de un hueso de estructura y mineralización normales en todos los grupos experimentales de ambos sexos, según reveló la tinción con VOF. Se observaron zonas de hueso compacto y trabecular teñidos mayoritariamente de rojo con escasas zonas teñidas de azul que se circunscribieron principalmente a los márgenes del tejido (Fig. 6a-h). Se observó la presencia de numerosos osteocitos inmersos en la matriz ósea, aunque fue escasa la presencia de osteoblastos hipertróficos en la superficie del hueso (Fig. 6a-h). Asimismo, fue escasa la presencia de osteoclastos.

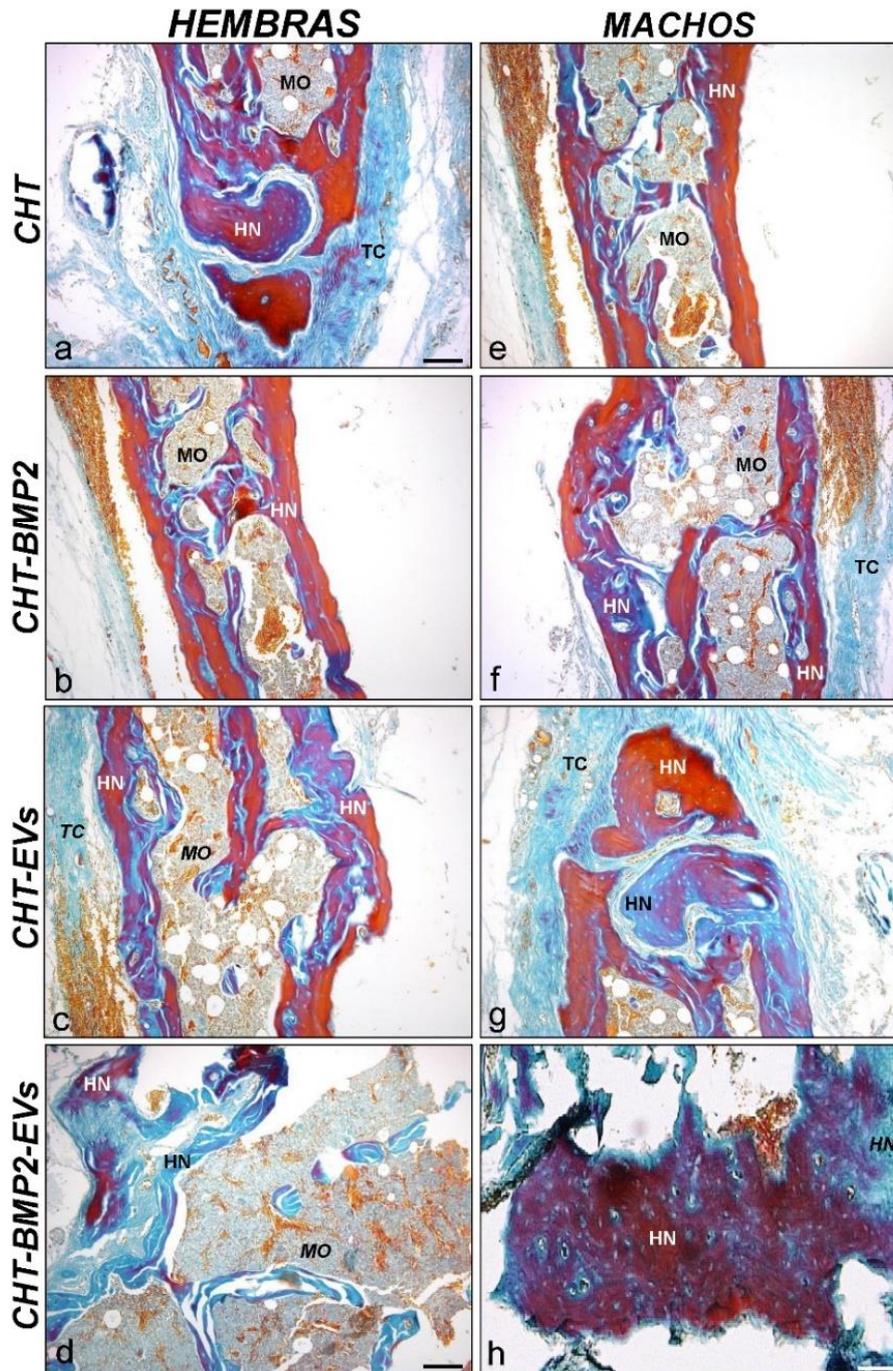


Figura 6. Imágenes semipanorámicas del hueso neoformado en los márgenes del defecto de calvaria en los diferentes grupos experimentales (CHT, CHT-BMP2, CHT-EVs y CHT-BMP2-EVs) en las que se observan las características estructurales del hueso, así como la diferencias en la coloración entre roja y azul que indican el grado de mineralización de hueso. Tinción Hematoxilina-VOF. HN: hueso neoformado; TC: tejido conectivo; MO: matriz ósea. Barras de escala: (a,b,c,e,f,g): 50 μ m; (d): 100 μ m; (h): 30 μ m.

El análisis histomorfométrico confirmó los resultados histológicos, revelando porcentajes de regeneración del defecto cuyos valores máximos estuvieron en torno al 30%.

En el caso de los machos, los grupos tratados con CHT, CHT-BMP2, CHT-EVs y CHT-BMP2-EVs presentaron porcentajes de regeneración del 15,98%, 18,93%, 20,62% y 26,58% respectivamente, siendo los grupos implantados con EVs los que presentaron mejores resultados, y mostrando el grupo CHT-BMP2-EVs diferencias significativas con el grupo CHT (Fig. 5B). En el caso de las hembras, si bien se observaron ligeras diferencias con respecto a los machos, los datos mostraron igualmente, como los grupos implantados con EVs, CHT-EVs y CHT-EVs-BMP2, exhibían los mejores porcentajes de regeneración con valores de 27,36% y 21,68% respectivamente. El análisis estadístico en este caso mostró diferencias significativas entre los grupos CHT-BMP2 y CHT-EVs (Fig. 5B). El análisis comparativo de los porcentajes de regeneración por sexos mostró diferencias significativas en los grupos CHT y CHT-BMP2-EVs entre hembras y machos (Fig. 7).

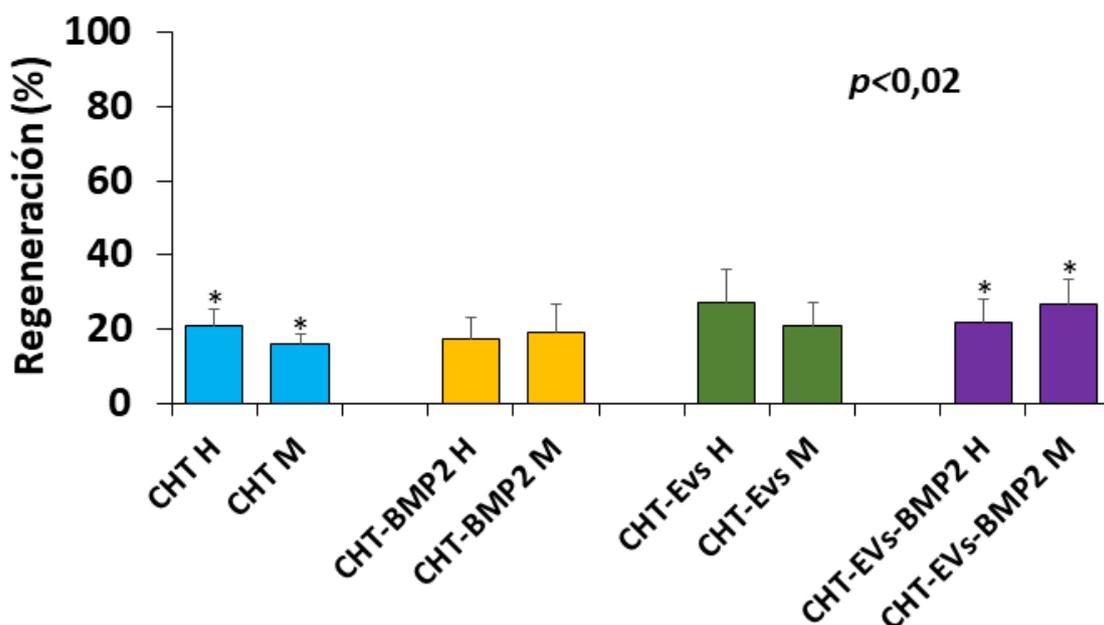


Figura 7. Análisis comparativo por sexos de los porcentajes de regeneración de la calvaria de los distintos grupos experimentales (CHT, CHT-BMP2, CHT-EVs y CHT-BMP2-EVs). Las barras representan medias \pm SD. El asterisco sobre diferentes histogramas indica diferencias significativas entre ellos.

8. Discusión

La regeneración ósea de defectos críticos es un desafío importante para la ingeniería de tejidos, en donde múltiples factores influyen en la eficacia del proceso. Este desafío es aún mayor si se consideran contextos o situaciones fisiopatológicas en las que los procesos normales de regeneración se ven mermados a consecuencia de desequilibrios en la homeostasis. En este estudio, se analiza la capacidad regenerativa de un sistema implantable conteniendo diferentes principios activos, en un defecto crítico de calvaria en un modelo animal de DM II. En concreto, se analiza como las distintas características del sistema implantable afectan al proceso de formación de hueso en un contexto fisiopatológico en el que procesos como la neovascularización, clave en la regeneración, están alterados y por consiguiente influyen en el éxito de esta.

En primer lugar, es importante destacar un factor crítico del sistema como es el tamaño de las microesferas. En este estudio, se obtuvo un tamaño de microesferas que ofrece un balance adecuado entre la superficie específica y el volumen. Esto facilita la encapsulación y la liberación controlada de factores de crecimiento y otros agentes bioactivos, lo que favorece la acción de dichos principios activos sobre procesos como la proliferación y diferenciación celular en las zonas de lesión. Otro factor crítico es la porosidad del sistema implantable. Una porosidad alta del 86,58 % como la obtenida en nuestro sistema de quitosano, es favorable por diversos factores; por un lado, mejora la difusión de nutrientes y oxígeno, lo que provoca un aumento de la permeabilidad que es importante para promover el crecimiento del tejido y mantener la viabilidad celular. Por otro lado, facilita la invasión celular proporcionando un entorno accesible para la migración y proliferación de las células y además esta porosidad permite la vascularización, sirviendo de soporte en la formación de nuevos vasos sanguíneos como ha sido descrito por diversos autores (Han *et al.*, 2014; Silvestro *et al.*, 2020).

Las propiedades de captación de agua y pérdida de masa del scaffold presentan interesantes implicaciones en la ingeniería de tejidos. Una elevada captación de agua por el sistema proporciona un entorno hidratado, que imita las propiedades de la matriz extracelular y del tejido natural, lo que favorece el crecimiento celular y la difusión de nutrientes, así como también de factores de crecimiento. Una baja tasa de pérdida de masa implica una degradación controlada del sistema, siendo esto esencial para asegurar que el scaffold brinde el soporte adecuado y se degrade a un ritmo que permita la formación del nuevo tejido (Han *et al.*, 2014; Saravanan *et al.*, 2016; Silvestro *et al.*, 2020). En nuestro

estudio, el sistema elaborado ha mostrado una tasa de captación de agua en torno al 80% y una pérdida de masa ligeramente inferior al 10% en una semana, lo cual indica que las características de este en ambos aspectos son óptimas, proporcionando un microambiente adecuado para favorecer los procesos de invasión, adhesión y proliferación celular, así como actuar de soporte durante las primeras fases del proceso de reparación.

Las EVs juegan un papel importante en la medicina regenerativa. La caracterización de estas es crucial para entender sus funciones y su potencial terapéutico. En este estudio, se han utilizado EVs obtenidas a partir de MSC estimuladas con BMP2. Las EVs aisladas mostraron un tamaño medio de 251,4 nm, relativamente más grande en comparación con otras EVs más pequeñas como los exosomas, cuyo tamaño suele estar en el rango de 40 a 150 nm. (Yeo *et al.*, 2013; Rovira *et al.*, 2017).

El índice de polidispersión indica la uniformidad de tamaño de las vesículas. En nuestro caso, hemos obtenido un valor de 0,24, lo que indica que las vesículas tienen una distribución de tamaños bastante homogénea y, por lo tanto, se encuentran dentro de los valores esperados o ideales (Miranda Vidales, 2023). Por otro lado, el valor de potencial zeta obtenido, de -11,88 mV parece indicar que hay una repulsión electrostática entre las vesículas, manteniéndolas dispersas y estables en suspensión (Soto-Cruz *et al.*, 2018; Midekessa *et al.*, 2020). Esta carga superficial negativa, representa una ventaja para su inclusión en el sistema a implantar, ya que el CHT tiene una carga superficial mayormente positiva, lo que permitiría crear uniones electrostáticas débiles que aumenten el tiempo de retención de las EVs.

Los sistemas implantables en los que se evaluó *in vitro* el efecto de las EVs aisladas de MSC estimuladas con BMP2, reflejaron una tasa de adhesión del 82,571%, esta fue menor que las del grupo control, si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Por otro lado, estos sistemas implantables mostraron una proliferación del 112,396%, lo que sugiere que la presencia de EVs, aunque no aumenta la adhesión, sí que favorece una mayor proliferación en el sistema. Nuestros resultados *in vitro*, sugieren que las EVs tienen un potencial significativo en la promoción de la regeneración tisular en concordancia con lo descrito por otros autores (Granados *et al.*, 2017; Martínez-Sánchez *et al.*, 2022), y pueden promover una mayor regeneración ósea *in vivo*. Diversos autores han puesto de manifiesto que la utilización de EVs aisladas de MSC cargadas en sistemas implantables pueden aumentar la respuesta regenerativa ósea (Al-Sharabi *et al.*, 2024, Diomedede *et al.*, 2018,

Swanson *et al.*, 2020), si bien, que seamos conscientes, es la primera vez que se estudia en animales diabéticos.

Los resultados observados *in vivo* mostraron formación de hueso nuevo principalmente en los márgenes del defecto con escasa presencia de hueso en el interior de este. Estos resultados están en concordancia con datos previos obtenidos en diversos estudios que emplean diversos enfoques sobre regeneración ósea (Lim *et al.*, 2013; Erezuma *et al.*, 2022). Concretamente, Lim *et al.* (2013) presenta resultados similares en su estudio, en el que la regeneración del hueso de la calvaria, en un modelo de rata intacto, se limita a los márgenes del defecto en comparación con el centro, en el que no observan signos de regeneración después de un periodo de 6 semanas postcirugía. De manera similar, el estudio de Erezuma *et al.*, (2022) obtiene resultados similares, en este caso en un modelo de ratón blanco intacto, en el que tras 8 semanas de implantación de un sistema conteniendo MSC o SDF-1, observan signos evidentes de regeneración en los márgenes del defecto, con relativa neoformación de hueso en el interior de este. Por otra parte, la presencia de tejido conjuntivo laxo en cantidades variables en el interior del defecto óseo es un indicador de que el proceso de regeneración está en desarrollo, ya que la osteosíntesis en huesos planos como los de la calvaria, se produce mediante osificación intramembranosa a partir de la formación de agregados de MSC en el seno de tejido conjuntivo (Estupiñán *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2022).

Los resultados obtenidos en este estudio en animales diabéticos de ambos sexos muestran porcentajes de regeneración que en el mejor de los casos se aproximan al 30% del área del defecto. La implementación del sistema implantable con BMP2, un inductor de la regeneración ósea que ha demostrado su eficacia en numerosos estudios (Hernández *et al.*, 2012a,b; Rodríguez-Évora *et al.*, 2014; Reyes *et al.*, 2018), así como con EVs, y con la combinación de ambos elementos, no ha mejorado sustancialmente la capacidad de regeneración del sistema con respecto al sistema blanco. No obstante, existen estudios en ratones intactos que empleando BMP2 como inductor de la regeneración obtienen porcentajes de regeneración similares a los obtenidos en este estudio (Lukin *et al.*, 2023). La explicación de la baja respuesta reparadora observada en este estudio es muy probable que esté en relación directa con la condición de DM que exhiben los animales. El contexto fisiopatológico de estos ratones db/db, que muestran obesidad y DM II y en el que los procesos de regeneración tisular están alterados, se refleja en una baja respuesta reparadora a pesar de la presencia de potentes inductores de la regeneración ósea como la

BMP2 y la presencia de EVs obtenidas a partir de MSC estimuladas con BMP2, las cuales han mostrado *in vitro* propiedades osteoinductoras.

La condición de DM II ha demostrado alterar y ralentizar el proceso de regeneración ósea. En un estudio reciente (Cai *et al.*, 2023), la reparación de un defecto crítico de fémur en un modelo de rata diabética, mostro en el análisis por microCT porcentajes de BV/TV en torno al 30%, frente a un 50% en animales control no diabéticos.

A pesar de la escasa respuesta reparadora obtenida en este estudio, el hueso neoformado en los márgenes del defecto, mostro características estructurales y de mineralización similares a las de un hueso normal. La estructura compacta y la coloración rojiza obtenida con la tinción de VOF revelaron una mineralización normal del hueso. Además, la presencia de abundantes osteocitos, y de escasos osteoblastos hipertróficos y osteoclastos en la superficie del hueso, sugieren una baja tasa de osteosíntesis y remodelado, indicativos de una reparación eficiente, aunque poco eficaz.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el paso siguiente debe ser, en una primera etapa confirmar la capacidad de los sistemas ensayados en ratones db heterocigotos de fenotipo normal, para confirmar el impacto de la condición de DM II en el proceso de regeneración del defecto óseo crítico; y en una segunda etapa, mejorar los sistemas utilizando otros materiales, diferentes dosis de BMP2 y de EVs, o modificando la formulación.

9. Conclusiones

Del presente trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Las microesferas de PLGA optimizadas presentaron un tamaño medio de 90,85 μm , adecuado para su utilización.
- Las EVs aisladas de MSC estimuladas con BMP2 presentaron un tamaño, índice de polidispersión y carga superficial adecuado.
- La inclusión de las EVs en los sistemas implantables de quitosano no mejoró significativamente la adhesión, pero si la proliferación de MCS.
- El sistema presentó una alta porosidad y captación de agua, y una baja pérdida de masa, haciéndolo óptimo para su implantación.

- Los sistemas blancos implantados, así como los sistemas conteniendo BMP2, EVs o ambos, mostraron *in vivo* eficacia similar en la regeneración del defecto óseo crítico de calvaria.
- El hueso regenerado mostró características estructurales y de mineralización similares al hueso normal en todos los grupos experimentales.
- No se observaron diferencias ni en el porcentaje de regeneración ni en las características del hueso regenerado entre machos y hembras.

10. Bibliografía

1. Al-Sharabi, N., Mohamed-Ahmed, S., Shanbhag, S. et al. Osteogenic human MSC-derived extracellular vesicles regulate MSC activity and osteogenic differentiation and promote bone regeneration in a rat calvarial defect model. *Stem Cell Res Ther* 15, 33 (2024). <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03639-x>
2. Álvarez Barreto, J. F. (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2), 97-108. <https://biblat.unam.mx/es/revista/ret-revista-de-estudios-transdisciplinarios/articulo/regeneracion-osea-a-traves-de-la-ingenieria-de-tejidos-una-introduccion>
3. Arboleya, L., & Castañeda, S. (2013). Osteoinmunología: el estudio de la relación entre el sistema inmune y el tejido óseo. *Reumatología clínica*, 9 (5), 303–315. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2013.02.008>
4. Cai F, Liu Y, Liu K, Zhao R, Chen W, Yusufu A, Liu Y Diabetes mellitus impairs bone regeneration and biomechanics. *J Orthop Surg Res*. 2023 Mar 6;18(1):169. doi: 10.1186/s13018-023-03644-5.
5. Casado-Díaz, A., Jiménez-Navarro, C., Torrecillas-Baena, B., Camacho-Cardenosa, M., Quesada-Gómez, J. M., & Gálvez-Moreno, M. Á. (2023). Effect of extracellular vesicles derived from hypoxia-preconditioned human mesenchymal stem cells on osteoblastogenesis and adipogenesis *in vitro*. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. <https://doi.org/10.20960/revosteoporosmetabminer.00012>
6. Castañeda, S., Garcés-Puentes, M., & Pineda, M. B. (2021). Fisiopatología de la osteoporosis en las enfermedades articulares inflamatorias crónicas. <https://www.redalyc.org/journal/3609/360966808006/html>
7. Chambers TJ. Regulation of the differentiation and function of osteoclast. *J Pathol* 192:4-13, 2000
8. Correa-Araujo, L., Lara-Bertrand, A., & Silva-Cote, I. (2024). Tissue engineering scaffolds: The importance of collagen. En P. N. Mazumder (Ed.), *Collagen for Health* [Working Title]. IntechOpen.

9. Devescovi, V., Leonardi, E., Ciapetti, G., & Cenni, E. (2008). *Growth factors in bone repair*. *La Chirurgia degli organi di movimento*, 92(3), 161–168. <https://doi.org/10.1007/s12306-008-0064-1>
10. Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., & Giannoudis, P. V. (2011, May 31). *Bone Regeneration: Current concepts and Future Directions - BMC Medicine*. BioMed Central. <https://bmcmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7015-9-66>
11. Diomedede, F., Gugliandolo, A., Cardelli, P. et al. Three-dimensional printed PLA scaffold and human gingival stem cell-derived extracellular vesicles: a new tool for bone defect repair. *Stem Cell Res Ther* 9, 104 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0850-0>
12. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289:1501-1504, 2000
13. Erezuma I, Lukin I, Pimenta-Lopes C, Ventura F, Garcia-Garcia P, Reyes R, Arnau MR, Delgado A, Taebnia N, Kadumudi FB, Dolatshahi-Pirouz A, Orive G. Nanoclay-reinforced HA/alginate scaffolds as cell carriers and SDF-1 delivery-platforms for bone tissue engineering. *Int J Pharm*. 2022 Jul 25;623:121895. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121895
14. Estupiñán, E. C. R., Garzón, L. D. P., Romero, D. S. G., Cabrera, L. A., Bernal, C., Zakaria, F., & Mikán, J. (2010). Análisis histológico de implantes de apatita carbonatada porosa de síntesis seca y células de médula ósea de porcino. *Revista Med*, 18(1), 32. <https://doi.org/10.18359/rmed.1289>
15. Fabrès, V. (2010). Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva. *Revista Médica Clínica las Condes*, 21(3), 488-493. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(10\)70562-9](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(10)70562-9)
16. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., Canto Pingarrón, M. del, & Blanco Jerez, L. (2006a). *Bases Fisiológicas de la Regeneración ósea i: Histología y fisiología del tejido óseo*. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* (Internet). https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462006000100011
17. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., Canto Pingarrón, M. del, & Blanco Jerez, L. (2006b). *Bases Fisiológicas de la Regeneración ósea ii: El Proceso de Remodelado*. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* (Internet). https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462006000200012
18. Granados, M. V., Montesinos, J. J. M., & Pérez, M. A. Á. (2017). Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de médula ósea en andamios

- fibrilares de poli (ácido L-láctico) (PLA). *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 38(1), 288-296. <https://doi.org/10.17488/rmib.38.1.24>
19. Han, F., Dong, Y., Su, Z., Yin, R., Song, A., & Li, S. (2014). Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin–chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. *International Journal Of Pharmaceutics*, 476(1-2), 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.036>
 20. Henkel, J., Woodruff, M. A., Epari, D. R., Steck, R., Glatt, V., Dickinson, I. C., Choong, P. F. M., Schuetz, M. A., & Hutmacher, D. W. (2013). Bone regeneration based on tissue engineering conceptions — A 21st century perspective. *Bone Research*, 1(3), 216-248. <https://doi.org/10.4248/br201303002>
 21. Hernández A, Reyes R, Sánchez E, Rodríguez-Évora M, Delgado A, Évora C. In vivo osteogenic response to different ratios of BMP-2 and VEGF released from a biodegradable porous system. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Sep;100(9):2382-91. doi: 10.1002/jbm.a.34183
 22. Hernández A, Sánchez E, Soriano I, Reyes R, Delgado A, Évora C. Material-related effects of BMP-2 delivery systems on bone regeneration. *Acta Biomater*. 2012 Feb;8(2):781-91. doi: 10.1016/j.actbio.2011.10.008
 23. Huang, X., Lou, Y., Duan, Y., Liu, H., Tian, J., Shen, Y., & Wei, X. (2024). Biomaterial scaffolds in maxillofacial bone tissue engineering: A review of recent advances. *Bioactive Materials*, 33, 129–156. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.10.031>
 24. Jackuliak, P., & Payer, J. (2014). Osteoporosis, fractures, and diabetes. *International Journal of Endocrinology*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/820615>
 25. Kim, Y.-H., Vijayavenkataraman, S., & Cidonio, G. (2024). Biomaterials and scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *BMC Methods*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/s44330-024-00002-7>
 26. Lee, K., Silva, E. A., & Mooney, D. J. (2011). Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of the Royal Society, Interface*, 8(55), 153–170. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0223>
 27. Leotau Rodríguez, M. A., & Villamizar, H. A. (2010). OSTEOMIELITIS: UNA REVISIÓN DE LA LITERATURA. *Universidad y salud*, 12(1), 135–145. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0124-71072010000100015&script=sci_arttext
 28. Levasseur, R. (2019). Fisiología del tejido óseo. *EMC - Aparato locomotor*, 52 (2), 1–25. [https://doi.org/10.1016/s1286-935x\(19\)42130-8](https://doi.org/10.1016/s1286-935x(19)42130-8)
 29. Lim, J., Lee, J., Yun, H., Shin, H., & Park, E. K. (2013). Comparison of bone regeneration rate in flat and long bone defects: Calvarial and tibial bone. *Jo'jig Gonghag Gwa Jaesaeng Uihag/Tissue Engineering And Regenerative Medicine*, 10(6), 336-340. <https://doi.org/10.1007/s13770-013-1094-9>

30. López-Herradón, A., Lozano, D., Portal-Núñez, S., Ardura, J. A., Gutiérrez-Rojas, I., Maycas, M., Rodríguez, L., Varela, I., & Esbrit, P. (2014). Comparación de las acciones osteogénicas de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) en modelos de ratón diabético y con déficit del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I). *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 6(2), 46–56. <https://doi.org/10.4321/s1889-836x2014000200004>
31. Lukin I, Erezuma I, Garcia-Garcia P, Reyes R, Evora C, Kadumudi FB, Dolatshahi-Pirouz A, Orive G Sumecton reinforced gelatin-based scaffolds for cell-free bone regeneration. *Int J Biol Macromol*. 2023 Sep 30;249:126023. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126023
32. Marin, C., Luyten, F. P., Van der Schueren, B., Kerckhofs, G., & Vandamme, K. (2018). The impact of type 2 diabetes on bone fracture healing. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00006>
33. Martínez Álvarez, O., Barone, A., Covani, U., Fernández Ruíz, A., Jiménez Guerra, A., Monsalve Guil, L., & Velasco Ortega, E. (2018). Injertos óseos y biomateriales en implantología oral. *Avances en odontoestomatología*, 34(3), 111-119. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852018000300002
34. Martínez-Sánchez, L. M., Saavedra-Valencia, M. E., Gil-Ramos, J. M., Martínez-Sánchez, L. M., Saavedra-Valencia, M. E., & Gil-Ramos, J. M. (2022). Papel de los exosomas en la angiogénesis, revascularización y respuesta inmune. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-02892022000200008&script=sci_arttext&tlng=pt
35. Midekessa, G., Godakumara, K., Ord, J., Viil, J., Lättekivi, F., Dissanayake, K., Kopanchuk, S., Rincken, A., Andronowska, A., Bhattacharjee, S., Rincken, T., & Fazeli, A. (2020). Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability. *ACS Omega*, 5(27), 16701-16710. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01582>
36. Miranda Vidales, A. (2023). *Formulación y caracterización de liposomas de cannabidiol para uso tópico*. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. Repositorio de tesis de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/8411>
37. Mora-Zúñiga, A., Cárdenas-Arellano, F., Cruz-Munguía, J. D., & Hernández-Carrillo, J. E. (2021). Osteomielitis crónica de tibia; uso de vidrio bioactivo como complemento de tratamiento. *Acta ortopedica mexicana*, 35(5), 461–464. <https://doi.org/10.35366/104575>
38. Nikolova, MP y Chavali, MS (2019). Avances recientes en biomateriales para andamios 3D: una revisión. *Materiales bioactivos*, 4, 271–292. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005>
39. Oliveira, É. R., Nie, L., Podstawczyk, D., Allahbakhsh, A., Ratnayake, J., Brasil, D. L., & Shavandi, A. (2021). Advances in growth factor delivery for bone tissue

- engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 903. <https://doi.org/10.3390/ijms22020903>
40. Palma Peña, S., Arenas San Martin, M., González Elso, F., Hidalgo Rivas, A., & Palma Díaz, E. (2021). Influencia de la diabetes mellitus en el tratamiento ortodóncico. Revisión de la literatura. *Avances En Odontoestomatología*, 37(3), 140–146. <https://doi.org/10.4321/s0213-12852021000300005>
 41. Pan, L., Zhang, X., & Gao, Q. (2021). Effects and mechanisms of histatins as novel skin wound-healing agents. *Journal of Tissue Viability*, 30(2), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2021.01.005>
 42. Qu, H., Fu, H., Han, Z., & Sun, Y. (2019, August 21). *Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A Review*. RSC Advances. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/ra/c9ra05214c>
 43. Reyes R, Rodríguez JA, Orbe J, Arnau MR, Évora C, Delgado A. Combined sustained release of BMP2 and MMP10 accelerates bone formation and mineralization of calvaria critical size defect in mice. *Drug Deliv*. 2018 Nov;25(1):750-756. doi: 10.1080/10717544.2018.1446473
 44. Riancho, J. A., & Delgado-Calle, J. (2011). *Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto*. *Reumatología Clínica*, 7, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2011.03.003>
 45. Rodríguez-Evora M, Reyes R, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Delgado A, Evora C. Bone regeneration induced by an in situ gel-forming poloxamine, bone morphogenetic protein-2 system. *J Biomed Nanotechnol*. 2014 Jun;10(6):959-69
 46. Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., & Grigolo, B. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science And Engineering: C*, 78, 1246-1262. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>
 47. Rovira, J., Diekmann, F., Campistol, J. M., & Ramírez-Bajo, M. J. (2017). Uso terapéutico de las vesículas extracelulares en insuficiencia renal aguda y crónica. *Nefrología/Nefrología*, 37(2), 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2016.04.006>
 48. Sabado-Bundo, H., Sanchez-Garces, M. Á., & Gay-Escoda, C. (2019). Bone regeneration in diabetic patients. A systematic review. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 0–0. <https://doi.org/10.4317/medoral.22889>
 49. Saravanan, S., Leena, R., & Selvamurugan, N. (2016). Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 93, 1354-1365. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.112>
 50. Sierra-García, G. D., Castro-Ríos, R., González-Horta, A., Lara-Arias, J., & Chávez-Montes, y. A. (2016). Proteínas morfogenéticas óseas (BMP): aplicación clínica para reconstrucción de defectos en hueso. *Org.mx*. https://www.anmm.org.mx/GMM/2016/n3/GMM_152_2016_3_381-385.pdf

51. Silvestro, I., Francolini, I., Di Lisio, V., Martinelli, A., Pietrelli, L., D'Abusco, A. S., Scoppio, A., & Piozzi, A. (2020). Preparation and Characterization of TPP-Chitosan Crosslinked Scaffolds for Tissue Engineering. *Materials*, 13(16), 3577. <https://doi.org/10.3390/ma13163577>
52. Soto-Cruz, J., Alvarado-Aguilar, P., Vega-Baudrit, J. R., Redondo-Gómez, C., Soto-Tellini, V., Madrigal-Carballo, S., & Rojas-Carrillo, O. (2018). *Caracterización estructural de vesículas modificadas con quitosano*. <https://www.redalyc.org/journal/4759/475958170003/html/>
53. Stallmann, H. P., Faber, C., Bronckers, A. L. J. J., de Blicke-Hogervorst, J. M. A., Brouwer, C. P. J. M., Amerongen, A. V. N., & Wuisman, P. I. J. M. (2005). Histatin and lactoferrin derived peptides: Antimicrobial properties and effects on mammalian cells. *Peptides*, 26(12), 2355–2359. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.05.014>
54. Swanson, W. B., Zhang, Z., Xiu, K., Gong, T., Eberle, M., Wang, Z., & Ma, P. X. (2020). Scaffolds with controlled release of pro-mineralization exosomes to promote craniofacial bone healing without cell transplantation. *Acta biomaterialia*, 118, 215–232. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.052>
55. Ugalde Ovaras, C. E., & Morales Castro, D. (2014). Osteomielitis. *Medicina legal de Costa Rica*, 31(1), 94–102. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000100010
56. Yeo, R. W. Y., Lai, R. C., Zhang, B., Tan, S. S., Yin, Y., Teh, B. J., & Lim, S. K. (2013). Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(3), 336-341. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.001>
57. Zare, I., Mirshafiei, M., Kheilnezhad, B., Far, B. F., Hassanpour, M., Pishbin, E., Eftekhari Vaghefi, S. S., Yazdian, F., Rashedi, H., Hasan, A., Wang, X., Adeli, M., & Makvandi, P. (2024). Hydrogel-integrated graphene superstructures for tissue engineering: From periodontal to neural regeneration. *Carbon*, 223(118970), 118970. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2024.118970>
58. Zhang, Y., Wu, D., Zhao, X., Pakvasa, M., Tucker, AB, Luo, H., Qin, KH, Hu, DA, Wang, EJ, Li, AJ, Zhang, M., Mao, Y., Sabharwal, M., He, F., Niu, C., Wang, H., Huang, L., Shi, D., Liu, Q.,... El Dafrawy, M. (2020). Biomateriales de soporte compatibles con células madre: aplicaciones para la ingeniería del tejido óseo y la medicina regenerativa. *Fronteras de la bioingeniería y la biotecnología*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.598607>
59. Zhu, L., Liu, Y., Wang, A., Zhu, Z., Li, Y., Zhu, C., Che, Z., Liu, T., Li, H., & Huang, L. (2022). Application of BMP in bone tissue engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.810880>