

LA ACADEMIA DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS DE ESPAÑA

“REGENERACIÓN ÓSEA PRESENTE Y FUTURO”

DISCURSO

PRONUNCIADO POR EL

Excmo. Dr. D. José Vicente Sanz Casado

EN EL ACTO DE SU TOMA DE POSESIÓN COMO ACADÉMICO
DE NÚMERO EL DÍA 14 DE MARZO DE 2016

Y LA CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO DE NÚMERO

Excmo. Dr. D. Antonio Bascones Martínez



MADRID
MMXVI

LA ACADEMIA DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS DE ESPAÑA

**“REGENERACIÓN ÓSEA
PRESENTE Y FUTURO”**

**DISCURSO
PRONUNCIADO POR EL
Excmo. Dr. D. José Vicente Sanz Casado**

**EN EL ACTO DE SU TOMA DE POSESIÓN COMO ACADÉMICO
DE NÚMERO EL DÍA 14 DE MARZO DE 2016**

**Y LA CONTESTACIÓN DEL
Excmo. Dr. D. Antonio Bascones Martínez**



**MADRID
MMXVI**

DEPOSITO LEGAL: M-4621-2016
IMPRESO EN ESPAÑA

SUMARIO

“REGENERACIÓN ÓSEA PRESENTE Y FUTURO”

I. INTRODUCCIÓN.....	9
II. FACTORES DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE HACIA OSTEOBLASTOS	10
III. CÉLULAS MADRE	13
IV. CÉLULAS MADRE ADULTAS (SOMÁTICAS)	14
V. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS VS CÉLULAS MADRE DE ORIGEN ADULTO	16
VI. FACTORES DE DIFERENCIACIÓN	17
VII. CONCLUSIÓN	31
VIII. BIBLIOGRAFÍA	33
CONTESTACIÓN DEL DR. ANTONIO BASCONES.....	43

DISCURSO DEL
Excmo. Dr. D. José Vicente Sanz Casado

Excmo. Srs. Presidentes de la Real Academia Nacional de Farmacia y de la
Real Academia de Doctores de España,
Excmo. Sr. Secretario de la Comisión Gestora de la Academia de Ciencias
Odontológicas de España,
Excmo. Sras. y Sres. Académicos,
Señoras y Señores,

Es para mí un gran honor haber sido propuesto como Académico de Número en esta Academia de Ciencias Odontológicas. Supone un enorme privilegio poder compartir con tan ilustres miembros los trabajos y fines de esta institución.

En primer lugar, quisiera expresar mi gratitud a mi amigo el profesor Antonio Bascones. Hoy estoy aquí gracias a la confianza que él ha depositado en mí. Lo conozco desde hace muchos años; fue mi profesor en la Facultad de Odontología y, desde el primer día, me impresionó su capacidad de trabajo, entusiasmo, conocimiento y, lo más importante, su pasión por la enseñanza y la universidad. A él debo mi amor a esta magnífica profesión; él ha sido un auténtico maestro.

También quiero expresar mi agradecimiento a mis maestros, los profesores D. Juan de Dios García García y D. Juan Jiménez Collado. A ellos les debo todo lo que soy como universitario; me inculcaron el amor por la docencia y la investigación, han sido ejemplo y guía en mi devenir universitario.

Agradecer a mi mujer Julia y, a mis dos hijos, Javier y Almudena. Con su paciencia, comprensión y cariño han soportado mi dedicación al trabajo. Siempre han estado a mi lado ofreciendo su apoyo y estímulo. Sin ellos estoy seguro que no habría podido alcanzar los logros conseguidos

Por último no puedo dejar de mencionar a mi amigo, el Profesor López Lacomba, por desgracia fallecido recientemente. A él debo el haberme adentrado en este apasionante mundo de la "ingeniería de tejidos". El creó y lideró un excelente grupo de investigación al que me siento orgulloso de pertenecer. Con su carácter, inteligencia y enorme humanidad consiguió que fuera mejor persona y me descubrió la esencia de la vida.

El tema que he seleccionado para este discurso de ingreso es un homenaje hacia él y recoge en parte los frutos de su trabajo sobre regeneración ósea.

I. INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido conjuntivo especializado compuesto por matriz extracelular mineralizada que le confiere rigidez, fuerza y una cierta elasticidad. Está constituido por una matriz orgánica mineralizada, células y canales vasculares. La matriz orgánica constituye el 33% de su peso; compuesta principalmente por colágeno de tipo I (95%), proteoglicanos y proteínas no colágenas (5%). Además contiene cuatro tipos de células: osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células alineadas. Gracias a ellas se producen de forma natural procesos de formación, osificación, modelado y remodelado óseo, procesos dinámicos que se alternan en el tiempo y hacen del hueso una estructura viva en constante cambio.

Todas estas características permiten que, ante una lesión, el hueso sea capaz de autoregenerarse, siempre que el defecto no sea crítico, formando un tejido idéntico al original.

En la cavidad oral, los defectos producidos en los maxilares, bien por patologías diversas, bien por la aplicación de técnicas quirúrgicas agresivas, suponen un contratiempo importante para el tratamiento rehabilitador, causando en muchos pacientes problemas funcionales y estéticos difíciles de solucionar.

La aplicación de técnicas de regeneración ósea suele ser el método utilizado para ayudar a reparar la mayoría de defectos pequeños y medianos en la cavidad oral, no siendo preciso usar complejas técnicas de reconstrucción microquirúrgica.

Como material de elección para reparar estos defectos se ha utilizado hueso autólogo. Las fuentes de obtención son diversas dependiendo su elección de la cantidad de tejido necesaria para reparar el defecto producido. En la cavidad oral se utiliza como donante la sínfisis mentoniana, trígono retromolar, rama de la mandíbula, tuberosidad del maxilar o el hueso cigoma. Fuera de la cavidad oral, el lugar de elección ha sido la cresta iliaca del coxal. De ella se obtiene hueso en cantidad suficiente para el relleno de grandes defectos. También se han utilizado otras localizaciones como la calota craneana, la tibia y las costillas.

La utilización de hueso autólogo tiene sus inconvenientes, sobre todo los derivados de la lesión provocada en la zona donante.

El desarrollo de los bancos de hueso ha permitido utilizar como donante hueso liofilizado y desmineralizado de cadáver para la regeneración ósea. El papel desempeñado por este tipo de injertos es muy controvertido en la actualidad.

Otro grupo importante de elementos utilizados para la reparación de defectos lo constituye el grupo de biomateriales. Se han usado osteoconductores como la hidroxiapatita, fibrina, colágeno, fosfato tricálcico, sulfato cálcico, etc. Aplicados de forma aislada o combinados con hueso autólogo o heterólogo.

También se utilizan membranas, reabsorbibles o no reabsorbibles, aplicando los conceptos de regeneración ósea guiada para intentar regenerar hueso en los defectos óseos e incluso se aplican complejos tratamientos con distractores para intentar reconstruir defectos y lesiones.

En la actualidad se está aplicando un nuevo enfoque en el tratamiento de los problemas asociados a la reparación de las lesiones óseas. No se trata ya de "reparar" en el sentido clásico del término, sino de estimular los procesos de autorregeneración ósea existentes de forma natural en el hueso, facilitándolos, induciéndolos o incluso provocando su extensión a defectos de un tamaño superior al crítico, de forma que no sean necesarios tratamientos quirúrgicos sustitutorios.

Este nuevo enfoque está basado en la aplicación de técnicas de ingeniería de tejidos. Se basan en la utilización de los tres elementos clave en la formación de cualquier tejido: la combinación de células, matriz y factores de diferenciación. El objetivo es crear un tejido idéntico al original, tanto estructural como funcionalmente.

II. FACTORES DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE HACIA OSTEÓBLASTOS

Un área mayoritaria dentro de la medicina regenerativa es la diferenciación de células madre hacia linaje osteoblástico para su posterior uso en ingeniería de tejidos y cirugía reconstructiva. Este campo está ganando importancia

progresivamente en los últimos años debido al aumento de la incidencia de enfermedades degenerativas óseas en la cada vez más envejecida población de los países desarrollados. Concretamente, podemos considerar la osteoporosis y osteoartritis como unos de los problemas más relevantes a nivel de salud pública, debido a que afectan a un gran número de personas de elevada edad. Además de para las enfermedades oseodegenerativas relacionadas con la edad, la terapia basada en la diferenciación de células madre se utiliza como tratamiento de las lesiones óseas traumáticas, así como de los defectos óseos producidos por enfermedades congénitas o tumorales.

La escasez de células donantes, tejidos y órganos es el principal problema de la medicina de trasplantes. Esta situación puede ser mejorada con el uso de células madre autólogas, bien sean adultas (de médula ósea) o embrionarias. Las células madre se distinguen de las células progenitoras por su capacidad de autorrenovación y de diferenciación en múltiples linajes celulares, mientras que las células progenitoras solo tienen capacidad de diferenciación a distintos linajes celulares, sin tener esa capacidad de autorrenovación. Es esta capacidad de autorrenovación la que hace a las células madre realmente útiles en medicina de trasplantes, puesto que de esta forma se puede proporcionar una inagotable fuente de material de trasplante.

La diferenciación celular es un proceso complejo que se produce de forma continuada en el organismo de un individuo: desde la etapa embrionaria, hasta el momento en que el organismo necesita realizar la reparación de un tejido.

En dicho proceso son necesarios varios componentes: el primero de ellos se trata de una célula indiferenciada con capacidad para diferenciarse, y el segundo componente son una serie de factores que influyan sobre esa célula y dirijan su diferenciación hacia la línea celular que nos interesa.

Este proceso de diferenciación, entre otros, se produce cuando se quiere reparar un defecto producido en un hueso. Estaría englobado dentro de un concepto más amplio denominado regeneración ósea, que comprende una serie de procesos de migración celular, proliferación y diferenciación.

La regeneración ósea se ha enfocado de diferentes formas a lo largo de la historia, analizándose sucesivamente todos los factores que intervienen en el proceso de cicatrización del hueso y viendo la incidencia de los diferentes biomateriales sobre la reparación de los defectos y lesiones óseas.

El concepto actual, aplicando criterios de ingeniería tisular, conlleva la utilización de células indiferenciadas, y de forma específica factores de diferenciación fenotípica hacia la línea osteoblástica, con el fin de conseguir un tejido similar en función y estructura al tejido lesionado.

Existen multitud de aproximaciones para la regeneración del tejido óseo, que se sustentan, principalmente, en la implantación en el área de la lesión de alguno de estos tres pilares: moléculas morfogenéticas, **matrices** y células formadoras de tejido.

En general, en el tejido óseo, las matrices han de dar estabilidad biomecánica al hueso y facilitar la adhesión, proliferación y diferenciación celular, verdadero eje de la regeneración del tejido óseo.

El **componente celular** indiferenciado por autonomasia son las células madre. Generalmente se opta por células autólogas, más seguras desde el punto de vista inmunológico, aunque la potencialidad de dichas células es inversamente proporcional a la facilidad de su obtención. Dentro del organismo adulto se han descubierto fuentes de células madre que, si bien no tienen tanta capacidad como las células madre embrionarias, sí son lo suficiente potentes como para diferenciarse hacia una extirpe celular determinada, en este caso osteoblastos, siempre y cuando se guíe adecuadamente esa diferenciación. Es por ello que actualmente se tiende hacia el diseño de terapias basadas en cultivos celulares, ya que aumentan la posibilidad de formar una masa considerable de tejido nuevo.

Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, estas células actúan y responden a los diferentes factores de su entorno (mecánicos, eléctricos, estructurales o químicos). En este sentido los factores de crecimiento desempeñan un papel fundamental ya que regulan acciones celulares tales como la migración, la proliferación o la morfogénesis y la diferenciación. Estos **factores** juegan un papel importante en los procesos de remodelado y reparación ósea, así como en la diferenciación de células indiferenciadas hacia fenotipo osteoblástico con el fin de generar tejido óseo. Además de los **factores de crecimiento** existen otro tipo de factores que influyen en la diferenciación de células madre hacia osteoblastos, los cuales se han utilizado como base de diferentes estrategias para lograr esa diferenciación dirigida hacia linajes osteoblásticos.

El proceso de desarrollo óseo comprende 4 fases distintas:

1. Migración de células con potencial osteogénico a la zona de futura osteogénesis.
2. A continuación, se produce una serie de interacciones ecto-mesenquimales que conducirán a la posterior fase de condensación.
3. En la fase de condensación, se produce una agregación de células mesenquimales (células madre mesenquimales).
4. Finalmente, se producirá la diferenciación de dichas células mesenquimales hacia linaje celular osteoblástico o condroblástico en función del ecosistema y factores que se encuentren a su alrededor.

La osteogénesis *in situ* puede producirse de dos formas distintas: en primer lugar, se puede producir una osificación endocondral, en la que el tejido óseo mineralizado se forma en torno a una matriz de tejido cartilaginosa. En segundo lugar, se puede producir una osificación intramembranosa, en la que una condensación de células mesenquimales se diferencian hacia osteoblastos en núcleos de osificación sin necesidad de una matriz de tejido cartilaginosa.

La diferenciación de las células mesenquimales hacia osteoblastos se acompaña de una secreción simultánea de un complejo de matriz extracelular formado por colágeno, sialoproteína ósea, varios proteoglicanos y otras proteínas. Este complejo de matriz extracelular inicia un proceso de mineralización del tejido para formar el hueso calcificado final.

Por tanto, para llevar a cabo un proceso de osteogénesis se necesita una serie de componentes. En primer lugar, la presencia de linaje celular indiferenciado: células madre¹⁻³.

III. CÉLULAS MADRE

En los estadios iniciales del periodo embrionario, las células pueden optar hacia tres posibles direcciones (las tres capas embrionarias): ectodermo, mesodermo y endodermo.

A partir de los tejidos del ectodermo se forman las células del sistema nervioso, con toda su variedad, así como otras propias de los tejidos epidérmicos.

Las células presentes en el mesodermo, a través de su multiplicación y diferenciación, originarán dos líneas fundamentales de células progenitoras. Por un lado, la línea que genera células musculares (miocitos), de tejido graso (adipocitos), células de hueso y cartílago, y otras muchas integrantes de vísceras como el riñón.

La otra es la línea de células progenitoras que da lugar a todo el **sistema hematopoyético**, un conjunto de células cuyas características ejemplifican como ninguna otra lo que constituyen las células madre. El sistema hematopoyético se aloja fundamentalmente en los huesos y da lugar a poblaciones celulares fundamentales para la sangre y para el sistema inmunitario.

Se ha llegado a postular que esta línea de células progenitoras, a lo largo de la vida adulta, **alimenta otras reservas de células madre** que pueden ser típicas de otros órganos o tejidos distintos de los que derivan de la médula ósea.

Finalmente, el endodermo alberga las células de las que se originan los aparatos respiratorio y digestivo, así como el hígado o diversas glándulas de secreción interna.

Por lo tanto, las células madre son células **autorrenovables** con capacidad de generar uno o más tipos celulares especializados. **Indiferenciación y plasticidad** son sus características definitorias. Conforme se van multiplicando, parte de esas células madre van perdiendo esa potencialidad, en pos de adquirir especialización. Sin embargo, hay siempre un grupo de esas células que se quedan indiferenciadas, manteniendo esa troncalidad.

Hay sustancias que pueden aportar señales adecuadas que las células pueden reconocer, se podrá así cultivar células madre y obtener a partir de ellas otras células con la diferenciación apropiada. Estas sustancias son denominadas **factores de crecimiento**.

Es posible dirigir el desarrollo de las células madre de origen embrionario activando su capacidad de generar diferentes tipos celulares concretos, a la par que se multiplican. Para ello se emplean sustancias que estimulan su diferenciación en determinadas direcciones, con lo que se ha podido observar que las células derivadas del embrión originan otras con apariencia y propiedades de células especializadas. **La estimulación en general se logra con factores de crecimiento conocidos por inducir el desarrollo de las células hacia formas diferenciadas.** Hay una gran variedad de sustancias inductoras del crecimiento y diferenciación debido a su acción sobre las células animales. Entre ellas las hay de composición definida como el ácido retinoico, otras de naturaleza más compleja como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) o numerosas proteínas bien identificadas (BMP). Hay proteínas inmunomoduladoras (interleucinas) o anticuerpos dirigidos frente a componentes de la membrana celular, que pueden activar la expansión de poblaciones celulares al provocar su crecimiento. Proteínas conocidas como

factores de crecimiento, entre ellas, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento de plaquetas, factor inhibidor de la leucemia, proteínas morfogenéticas óseas...¹⁻⁴.

Las células tienen en su membrana receptores capaces de percibir señales que les sirven de estímulo. Su programación genética determina la respuesta.

Las células embrionarias tienen un potencial muy elevado. El cigoto y las células que componen la mórula tienen la capacidad de originar cualquier tejido y estructura. Son células **totipotentes** ya que pueden generar un individuo completo. Al progresar el desarrollo del embrión, en la etapa de blastocisto, las células de la masa celular interna poseen una gran capacidad generadora de tejidos, pero ya no pueden formar un individuo completo. Estas son células madre **pluripotentes**.

Características de las células madre de origen embrionario^{4,5}:

- Notable plasticidad en su desarrollo (pluripotencialidad).
- Capacidad intensa para proliferar *in vitro*.
- Clonalidad y cariotipo estable en condiciones de laboratorio.
- Diferenciación a tipos celulares distintos, mediante estimulación adecuada.
- Susceptibles de modificación genética.
- Capacidad tumorigénica al ser transplantadas (formación de teratomas) debido a que el potencial de crecimiento es muy elevado.

IV. CÉLULAS MADRE ADULTAS (SOMÁTICAS)

La capacidad de **regenerar** piel, cuando por alguna razón se produce un daño en los tejidos epidérmicos es una experiencia común para todos. También se sabe que, desde hace tiempo, el tejido hepático, renal y, otros muchos, como el intestinal son susceptibles de regeneración. Existen reservas de células capaces de multiplicarse y desarrollarse, adoptando las características de las células altamente especializadas de ese organismo. Es decir, existen **células madre adultas**.

El prototipo de células regenerables son las **células de la sangre**. En la médula ósea, preferentemente, se localiza la capacidad hematopoyética que supone la regeneración de todas las células hemáticas a lo largo de toda la vida.

En la médula ósea radica el potencial de regeneración de tejidos más significativo del organismo. La médula ósea es la principal reserva de células madre de nuestro organismo.

En general, las células madre adultas, sin llegar a manifestar una pluripotencialidad como la de las células de origen embrionario, y careciendo del mismo vigor que estas en cuanto a crecimiento *in vitro*, sí **demuestran capacidades de generar tipos celulares distintos** en un grado mucho mayor del esperado. La denominación de **células multipotenciales** es la que mejor puede definir a las células madre adultas.

En el trabajo de Jiang et al⁶, estudian las células obtenidas de la médula ósea de ratón, de la que pueden aislar no solo las células progenitoras de la sangre, sino otras fracciones como las **células del mesénquima** de dicha médula ósea. Mostraron especial interés en una subpoblación de **células**

progenitoras, que se aislaban junto con las mesenquimales, y que mostraban un comportamiento propio de las células madre. Son células menos comprometidas destinadas a generar progenitores hematopoyéticos. Estas células, que fueron designadas como “**células progenitoras adultas multipotentes**” (MAPC), tienen gran estabilidad y gran capacidad de generar tipos celulares muy variados, que no están restringidos a los de las células sanguíneas.

Por tanto, en la médula ósea se albergan tres tipos de células madre: las mesenquimales, las diferenciadas ya a progenitores hematopoyéticos, y las mencionadas células descritas por Verfaillie (MAPC).

Este estudio en células mesenquimales de médula ósea de ratón concluyó:

- De la proliferación de algunas células tipo MAPC se podían obtener líneas celulares estables. Estas células podían diferenciarse a distintos tipos celulares mediante el empleo de distintos factores de crecimiento específicos, del tipo de los mencionados para las células madre de origen embrionario. Originaban células diferenciadas representativas de las tres capas embrionarias.
- Las células MAPC extraídas de médula ósea de ratón adulto fueron introducidas por inyección en un embrión de otro ratón, dando lugar a células de prácticamente todos los tipos presentes en el organismo adulto.
- Se practicaron injertos de células MAPC cultivadas, en ratones adultos, alojándolas en distintos órganos y tejidos, dando lugar a la integración con los mismos y contribuyendo a la formación de los tejidos del animal injertado.

Por tanto, queda demostrado que en el animal y en el hombre adulto existen reservas de células madre que pueden ser cultivadas con estabilidad. Estas células son capaces de contribuir a la creación de los tejidos del animal, tanto a lo largo del desarrollo embrionario y fetal, como en el propio adulto.

Características de las células madre adultas (multipotentes):

- Capacidad regeneradora de numerosos órganos y tejidos.
- El sistema hematopoyético es la reserva fundamental de células madre adultas.
- Presencia en piel, intestino, músculo esquelético, tejido adiposo, etc.
- Capacidad de cultivo limitada con respecto a las células madre embrionarias.

Las células madre adultas pueden ser específicas de determinados órganos en cuanto a su procedencia, pero su diferenciación no se restringe a generar células más diferenciadas propias de ese órgano.

Además, se ha demostrado que en la reparación de defectos tisulares, las células madre del tejido en cuestión tienen un papel importante en la reparación de ese defecto, y así lo confirman los estudios basados en terapia celular^{4,7,8}.

Aparte de la médula ósea, otras fuentes de obtención de células madre adultas son:

- Sangre (subpoblación de monocitos). También puede diferenciarse no solo a células hemáticas, sino también a células diferentes bajo la acción de factores de crecimiento⁴.
- Sangre (cordón umbilical)⁴.

- Tejido adiposo (transdiferenciación hacia osteoblastos entre otras)^{9,10}.
- Tejido adiposo de bola de Bichat¹¹.
- Tejido muscular¹².

V. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS VS CÉLULAS MADRE DE ORIGEN ADULTO

Según Heng et al., la ventaja más obvia de la utilización de células madre embrionarias con respecto a las células madre de origen adulto, es su inmortalidad, y por tanto su capacidad de proporcionar precursores osteoblásticos ilimitados para su trasplante. Además, la capacidad de autorrenovación de las células madre mesenquimales (de origen adulto), así como su capacidad de proliferación es mucho más limitada, y parece que disminuye con la edad. Esto limita su utilidad en la terapia de trasplante celular autólogo para el tratamiento de las enfermedades óseas degenerativas relacionadas con la edad, como puede ser osteoporosis u osteoartritis. Por otra parte, las células madre procedentes de la médula ósea (adultas) pueden contener mayor número de alteraciones genéticas que las células madre de origen embrionario, debido a la exposición de factores como la radiación solar y toxinas, así como errores en la replicación del ADN acumulados a lo largo de la vida.

El mayor inconveniente del uso de células madre de origen embrionario para su uso en la regeneración ósea es el rechazo inmunológico, el cual podría ser solucionado si la célula se obtiene de una fuente isogénica derivada de terapia de clonación. Esta solución es eminentemente teórica, debido a las múltiples complicaciones técnicas de la terapia de clonación. Otra alternativa más tangible sería la creación de un banco de células madre embrionarias con diferentes genotipos de complejo mayor de histocompatibilidad, con el fin de que coincidan con la zona del trasplante. También se ha barajado la opción de reducir la antigenicidad de las células madre de origen embrionario mediante la supresión de la expresión genética del complejo mayor de histocompatibilidad. Sin embargo, y pese a los inconvenientes antes enunciados de las células madre somáticas, estas poseen una serie de características que las hacen muy útiles para su uso práctico en medicina regenerativa: las células autólogas procedentes de la médula ósea del propio paciente, no tienen que superar ninguna barrera inmunológica de trasplante. Otro de los principales problemas de las células madre de origen embrionario es la capacidad teratogénica que tienen cuando se utilizan para su trasplante *in situ*, problema que no tenemos en el caso de las células madre somáticas. Además es mucho más fácil dirigir la diferenciación hacia linaje osteoblástico de las células madre somáticas en comparación con las células madre embrionarias^{3,4}.

Por lo tanto, aunque las células madre de origen embrionario son las que mayor potencialidad tienen a la vez que capacidad de diferenciación, se ha demostrado que las células madre de organismo adulto son suficientemente potentes en términos de capacidad de diferenciación como para diferenciarse a linaje osteoblástico y favorecer de esta forma la regeneración ósea. La ventaja fundamental de las células madre del organismo adulto es su facilidad de obtención, puesto que no solo se ha demostrado que se pueden obtener de médula ósea (células MAPC), sino que también se pueden obtener de tejidos mucho más accesibles como puede ser el tejido adiposo de la bola de Bichat.

El papel de las células madre en la regeneración ósea es innegable e imprescindible, sin embargo, como ya se ha comentado en repetidas ocasiones, de nada sirve tener un cultivo estable de células madre sin poder controlar la dirección de su diferenciación. Está, por tanto, íntimamente ligado al término célula madre, el término **factor de diferenciación**.

VI. FACTORES DE DIFERENCIACIÓN

1./ Factores de crecimiento y regeneración ósea

Desde hace algo más de una década, las investigaciones sobre regeneración ósea se han centrado fundamentalmente en el estudio del complejo papel que desempeñan los distintos factores de diferenciación en este proceso, y sobre todo, desde el punto de vista clínico, en cómo usar estos factores locales y/o sistémicos para aumentar la regeneración.

Existen multitud de factores que influyen en la dirección en la que se va a diferenciar una determinada célula indiferenciada. A continuación se hace una revisión de lo que la literatura afirma acerca de todos los factores que influyen en este proceso de diferenciación hacia el linaje osteoblástico concretamente:

En primer lugar, y como factores más estudiados a nivel local, está el uso de los factores exógenos de crecimiento y citoquinas (factores proteicos). Dentro de ellos encontramos:

- Hormona del crecimiento (GH) (Kroger, H.)¹³.
- Leptina (Thomas, T. et al.)¹⁴.
- Sortilina (Maeda, S. et al.)¹⁵
- Transglutaminasa (Nurminskaya, M. et al.)¹⁶.
- IGF I y II^{1,2}.
- TGF- β ^{1,2}.
- PDGF^{1,2}.
- BMPs y sus distintas isoformas^{1,2}.

Y los factores proteicos citoquímicos^{1,2}:

- Interleuquina 1 (IL-1).
- Interleuquina 6 (IL-6).
- Interleuquina 11 (IL-11).
- TNF.

2./ Factores de crecimiento proteicos

Los factores de crecimiento pueden definirse como proteínas producidas por células, bien óseas (factores locales), bien extraóseas (factores sistémicos) que actúan modulando las funciones celulares, fundamentalmente la **proliferación y la diferenciación**.

Entre los factores de crecimiento identificados presentes en los procesos de regeneración ósea se puede tal vez señalar el IGF, TGF- β , PDGF y BMP como los más estudiados¹⁻³.

- Los IGF (I y II) (factor de crecimiento insulínico) se secretan por los osteoblastos durante la formación ósea, aumentando la velocidad de deposición

- de nuevo hueso. Están presentes en la matriz (el IGF-II es el factor de crecimiento presente en mayor proporción en ella), se liberan de ella en los procesos de reabsorción ósea, permitiendo, por tanto, acoplar esta con la formación de nuevo hueso. Su acción se produce sobre células ya preosteoblásticas, aumentando su mitogénesis y estimulando también la formación de hueso por parte de los osteoblastos diferenciados ya existentes en la herida. Su acción se ve afectada por la **presencia de hormonas** (GH, estrógenos, progesterona) e inhibida por la acción de los glucocorticoides.
- Los TGF- β (factor de crecimiento y transformación beta) forman una superfamilia de proteínas (más de 40 miembros) entre las que se encuentran factores de crecimiento y diferenciación celular, como las **BMP**, que comparten algunos hechos estructurales comunes. Con este nombre se conoce fundamentalmente a dos de ellas, las TGF- β_1 y TGF- β_2 . Estas proteínas se sintetizan y se encuentran en plaquetas, macrófagos y osteoblastos, entre otros tipos celulares. Se trata de factores de crecimiento multifuncionales; tal vez el papel más importante desempeñado en la regeneración ósea sea el de quimiotaxis y mitogénesis de precursores osteoblásticos y de estimulación de la síntesis de matriz colágena, al mismo tiempo que actúan inhibiendo la actividad osteoclástica, así como la diferenciación de este tipo de células. Puesto que en el proceso de reparación de la herida pueden ser liberados tanto por los propios osteoblastos, como por plaquetas y macrófagos presentes en las primeras etapas, los TGF- β representan un mecanismo que permite no sólo la reparación inicial de la lesión, sino la reparación sostenida de esta e, incluso, la remodelación ósea. No obstante, dependiendo de su concentración y de otros factores pueden llegar a inhibir la proliferación osteoblástica y promover la reabsorción.
 - El PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) es el más ubicuo de los factores mencionados, debido a su presencia en dichas células, y se encuentra implicado en prácticamente todos los procesos de recuperación de heridas. Tiene asimismo un papel importante en los procesos de regeneración ósea. Es el primer factor de crecimiento presente en la herida a través de los coágulos sanguíneos. Sus acciones mitogénica (fibroblastos), angiogénica (favoreciendo el desarrollo de nuevos capilares) y de activación de macrófagos (fuentes de una segunda fase de factores de crecimiento que provocan a su vez la activación de funciones osteoblásticas y promueven la **diferenciación celular**) son fundamentales para la revascularización, síntesis de colágeno y regeneración ósea.
 - Las **BMP** (proteína morfogenética ósea) son tal vez los factores de crecimiento que más atención han recibido en los últimos tiempos por la comunidad científica en cuanto a factores inductores de la regeneración ósea. Se caracterizan por la capacidad de algunas de estas proteínas (se conocen más de 15 diferentes) de inducir la formación de hueso en sitios ectópicos. Presentes en muy pequeñas cantidades en la matriz ósea de forma natural. **Se ha demostrado su acción sobre células multipotentes e inmaduras, estimulando su diferenciación a líneas osteoblásticas, siendo establecidas como potentes osteoinductores y posterior mineralizadores de tejido**¹⁷⁻²⁰. Más concretamente, se ha demostrado que las isoformas 2, 6

y 9 de la BMP son las que más promueven la diferenciación osteoblástica de las células madre somáticas²¹. No ejercen acción, sin embargo, sobre células ya diferenciadas. Estas proteínas tienen una importante función en la regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis de diferentes tipos celulares, entre los que se encuentran los osteoblastos, condroblastos, células neurales y epiteliales. En las fracturas en reparación, donde existen gran cantidad de células inmaduras, se ha detectado la expresión de BMP, lo cual parece indicar que estas proteínas desempeñan un papel regulador durante el proceso de reparación de la fractura. Experimentos realizados sobre células obtenidas de fracturas sin recuperación muestran que las células sí son susceptibles de mostrar respuesta osteogénica ante la aplicación de BMP, por lo que tal vez el fallo en la reparación de las fracturas pueda deberse a un aporte insuficiente de ésta por parte del tejido circundante.

La situación que se presenta al comienzo de la reparación de una lesión ósea mediante injerto podría describirse, pues, como una mezcla compleja formada por plaquetas, leucocitos y glóbulos rojos, formando un agregado por la fibrina, que está en contacto, asimismo con células madre (en muy pequeño número), células estructurales y con capilares cortados con células endoteliales expuestas.

La regeneración comienza con la liberación de PDGF, TGF- β_1 e IGF en la desgranulación de las plaquetas en la zona de la herida. Estos factores de crecimiento activan la mitogénesis de las células madre de la médula aumentando su número varios órdenes de magnitud. Comienza asimismo la capilarización mediante la activación de la mitosis de las células endoteliales. El TGF- β activa también la proliferación de fibroblastos y preosteoblastos, a la vez que promueve la diferenciación de estos últimos hacia osteoblastos maduros.

El aporte continuado de TGF- β induce la deposición de la matriz ósea por parte de los osteoblastos, y de la matriz colágena por parte de los fibroblastos, favoreciendo así el crecimiento capilar en ella. Hacia el tercer día se puede ver penetración de los capilares en la zona de reparación, que es completa hacia los 14-17 días.

Inicialmente, los factores de crecimiento son liberados por las plaquetas presentes en el coágulo. Estas se sustituyen hacia el tercer o cuarto día por los macrófagos, atraídos hacia la lesión por acción del PDGF y del gradiente de oxígeno que existe entre la zona de la lesión (hipóxica) y el tejido normal que la rodea, como fuente primaria de estos factores.

La formación inicial de hueso surge de los osteoblastos presentes en la superficie de la lesión. La posición superficial de estos, permite sobrevivir tomando los nutrientes directamente mientras se produce la revascularización. Debido a que son osteoblastos ya diferenciados, comienza la formación osteoide directamente, mientras tienen lugar los procesos descritos de mitosis y diferenciación hacia células osteoblásticas inducida por el TGF- β y PDGF en las células madre.

Este hueso inicial, desorganizado y sin canales haversianos, se denomina hueso fase I y es el que se desarrolla durante las primeras 4 semanas. Hacia el fin de este periodo, la revascularización de la zona de la lesión elimina el gradiente de oxígeno necesario para la activación de los macrófagos ya innecesarios.

Comienza entonces la formación de hueso fase II, hueso ya maduro de arquitectura lamelar y con canales haversianos, mediante la acción sobre el hueso inmaduro de la fase I del IGF y de las BMP, presentes en la matriz ósea y que se liberan por la reabsorción osteoclástica de la remodelación normal ósea. **Estas proteínas ligan, pues, la reabsorción ósea con la formación de nuevo hueso, al actuar sobre células madre adyacentes y preosteoblastos, induciendo su diferenciación hacia osteoblastos funcionales que secretan activamente nueva matriz, introduciéndose de esa forma en el ciclo normal de reabsorción-remodelación ósea².**

De una forma resumida, podríamos decir que los factores de crecimiento liberados por las plaquetas actúan fundamentalmente en la formación de hueso fase I, mientras que las BMPs actuarían en la formación de hueso fase II. De ahí los dos enfoques investigadores acerca de los factores de crecimiento. En primer lugar se intenta aumentar la densidad de factores liberados por las plaquetas, para mejorar o acelerar la formación de hueso fase I, este sería el caso de la terapia de plasma rico en factores de crecimiento, mientras que el otro enfoque sería el de aumentar los factores de crecimiento que intervienen en la formación de hueso fase II, que son fundamentalmente las BMPs.

A nivel local, además de los factores de crecimiento, que son los que actúan a nivel de proliferación y diferenciación celular, también hay otro tipo de factores que influyen en la regeneración y reparación ósea. Estas son las citoquinas².

Las citoquinas son polipéptidos sintetizados en las células linfocíticas y monocíticas que desempeñan un importante papel en gran número de funciones celulares. En el hueso son importantes las siguientes:

- Interleuquina 1 (IL-1): estimula directamente la reabsorción osteoclástica.
- Interleuquina 6 (IL-6): estimula la reabsorción y se ha implicado en la patogenia de la enfermedad de Paget.
- Interleuquina 11 (IL-11): se produce en la médula ósea e induce la formación de osteoclastos.
- TNF (factor de necrosis tumoral): estimula *in vitro* la reabsorción y se ha relacionado con la pérdida ósea de artritis y enfermedad periodontal.
- Interferón gamma (IFN- γ): induce la formación de óxido nítrico que suprime la acción y formación de osteoclastos maduros, por lo que disminuye la reabsorción ósea.

Además de las citoquinas de origen proteico y los factores de crecimiento, una serie de compuestos químicos no proteicos han demostrado tener un papel en la diferenciación de células madre. Los compuestos químicos no proteicos identificados son:

- Prostaglandina E2 (Raisz, L. G. et al²² y Weinreb, M. et al²³).
- 1,25 Dihidroxitamina D3 (Van Leewen, J. P. et al²⁴).
- Dexametasona (Sottile, V. et al²⁵ y Zur Nieden, N. I. et al²⁶).
- Ácido ascórbico (isoforma L).
- β -glicerol fosfato.
- TAK-778 (Notoya, K. et al²⁷).
- Estatinas (Sugiyama, M. et al²⁸).

Estos compuestos químicos tienden a ser menos lábiles con una vida media más larga comparada con los factores proteicos, lo cual es una ventaja para su cultivo. Además, al contrario que los factores de crecimiento y citoquinas proteicas que tienen que ser sintetizados por células vivas, y posteriormente sometidos a modificaciones postranslacionales y procesos de purificación, los compuestos químicos no proteicos pueden ser fabricados mediante reacciones químicas en el laboratorio y, por lo tanto, son más definidos estructural y químicamente comparado con los factores proteicos.

La prostaglandina E₂ es un eicosanoide natural que se deriva del metabolismo del ácido araquidónico. Se ha demostrado que estimula tanto la proliferación como la diferenciación hacia osteoblastos de las células madre somáticas de la médula ósea^{22,23}.

La 1,25-dihidroxitamina D3, también conocida como calcitriol, es la forma activa de la vitamina D. Se ha demostrado que inhibe la diferenciación hacia linajes adiposos de las células madre de la médula ósea^{29,30} y estimula la diferenciación osteoblástica, así como la posterior mineralización del tejido²⁴.

La Dexametasona, un esteroide sintético, ha demostrado estimular la diferenciación hacia linajes osteoblásticos en células madre de origen adulto³¹. Se utiliza habitualmente en combinación con el ácido ascórbico (vitamina C) y el β-glicerol fosfato.

El TAK-778 es un compuesto sintético de reciente aparición que ha demostrado ser un potente inductor osteogénico tanto en animales como en modelos *in vitro*²⁷.

Las estatinas son una serie de compuestos químicos no proteicos que inhiben la enzima 3-hidroxi-3metilglutaril coenzima A reductasa, la cual juega un papel esencial en la generación del colesterol. De manera que además de su uso como fármaco reductor de los niveles sanguíneos de colesterol, también tiene un efecto profundo en la osteosíntesis y en la diferenciación hacia osteoblastos^{28,32,33}, pudiendo ser a su vez utilizado en el tratamiento de la osteoporosis.

3./ Sustrato de matrix extracelular (natural o sintética)

Otro grupo de factores que intervienen en la diferenciación de células madre hacia osteoblastos según la bibliografía son determinados compuestos contenidos en la matriz extracelular ósea.

El tejido óseo está compuesto por una mezcla heterogénea de tipos celulares (endoteliales y osteoides) embebidos en una matriz extracelular mineralizada que mantiene la integridad estructural del tejido. Esta matriz consta de componentes orgánicos e inorgánicos. El componente inorgánico de la matriz extracelular ósea, que es el responsable de la mayoría del peso de la misma, está compuesto principalmente por sales cálcicas en forma de hidroxapatita, y secundariamente por impurezas, de las cuales las más frecuentes son carbonatos. Además sales inorgánicas de magnesio, potasio, fluoruro, fosfato y citrato están también presentes en cantidades significativas. El componente orgánico de la matriz ósea extracelular está compuesto principalmente por colágeno de tipo I (95% del peso) junto a pequeñas cantidades de otras isoformas de colágeno, proteínas no colágenas (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, osteoadherina,

fibronectina, sialoproteína ósea y tromboespondina) y proteoglicanos. Además del papel estructural, la matriz extracelular ósea juega un papel en la fisiología del hueso influyendo en el microambiente de las células que están contenidas en ella. Estudios histológicos han revelado remodelado extenso de la matriz ósea extracelular durante el crecimiento y desarrollo, así como en determinadas condiciones patológicas².

Teniendo en cuenta todo lo anterior, la introducción de sustratos de matriz ósea extracelular apropiados en cultivos de células indiferenciadas inducen la diferenciación de las mismas hacia linajes osteoblásticos. Estos sustratos pueden ser obtenidos de forma natural o sintética³.

Hay una serie de propiedades de estos sustratos que son importantes en la osteoinducción y osteoconducción, y deben de ser ampliamente consideradas en términos de ingeniería de tejidos. Estas propiedades son: biocompatibilidad, ausencia de citotoxicidad, biodegradación y porosidad (diseño tridimensional).

La tasa de unión celular, proliferación y diferenciación osteogénica de células madre somáticas (adultas) en matriz ósea extracelular dependen de una serie de factores entre los cuales se incluyen:

- Composición química: el compuesto debe incorporar la parte orgánica e inorgánica que se encuentra habitualmente en la matriz ósea extracelular.
- Carga electrostática: Se ha demostrado que la presencia de cargas negativas en la superficie del compuesto son beneficiosas para la adhesión y extensión de las células madre.
- Textura/rugosidad de la superficie: Tienen un grado moderado de influencia en la adhesión celular. Se ha demostrado que el grado de madurez de la célula madre somática determina su sensibilidad hacia la textura de la superficie.
- Configuración geométrica (diseño tridimensional): Fundamental para la proliferación y diferenciación hacia osteoblastos así como la angiogénesis.

Componentes de la matriz ósea extracelular con capacidad osteogénica demostrada:

Colágeno tipo I

De los compuestos antes mencionados el colágeno tipo I es el más abundante:

Se ha demostrado que el **colágeno tipo I** estimula la adhesión y maduración de osteoblastos periósticos primarios en cultivos celulares *in vitro*^{34,35}. Además, otros tipos de colágeno menos frecuentes también han demostrado jugar un papel importante en la diferenciación hacia osteoblastos. Habitualmente, las matrices que se utilizan para ingeniería de tejidos complementan el colágeno tipo I con otro tipo de sustratos presentes en la matriz extracelular como son condroitin sulfato, ácido poliláctico, ácido poliláctico-coglicólico, politetrafluoroetileno (matrices compuestas). Estas matrices compuestas ofrecen unos resultados fantásticos en la diferenciación de células madre de origen adulto, como demuestra Nguyen et al³⁶ en su estudio. Con el fin de maximizar la influencia sobre células indiferenciadas y guiar su desarrollo hacia linajes osteoblásticos se ha aunado el poder inductor de estos compuestos con el de factores de crecimiento de efecto más que reconocido como las BMP obteniéndose resultados muy buenos³⁷. Otra proteína que, interactuando junto al colágeno, ha demostrado jugar

un papel fundamental en la diferenciación de células madre hacia osteoblastos es la fibronectina^{38,39}.

Glicosaminoglicanos

Son fundamentalmente moléculas formadas por cadenas largas de azúcares. El hialurónico ha demostrado ser un potente inductor de diferenciación osteogénica en células madre somáticas^{40,41}.

Además, se ha demostrado que glicosaminoglicanos como el heparán sulfato estimula la actividad biológica de la BMP y el FGF^{42,43}.

El perlecan, un proteoglicano que contiene heparán sulfato ha demostrado tener a su vez un papel fundamental en la osteogénesis⁴⁴.

Compuestos cálcicos mineralizados

Compuestos de fosfato cálcico en forma de hidroxiapatita han sido muy utilizados para la fabricación de matrices para la diferenciación osteogénica de las células madre. También se han utilizado fosfato α -tricálcico y β -fosfato tricálcico^{45-49,59}.

4./ Cocultivo y medio celular condicionado

Basado en la idea más que demostrada de que el comportamiento y la diferenciación de las células madre está condicionado por el medio en el que se encuentran, surge esta estrategia de diferenciación de las mismas. El cocultivo consiste en introducir las células madre en un cultivo junto a otros grupos celulares predefinidos para que sean estos los que actúen de guía para su diferenciación. Por tanto podríamos considerar el **medio** en el que se cultiva la célula madre como factor totalmente influyente en la dirección de su diferenciación. Se ha demostrado que el cocultivo de células madre junto a osteoblastos fetales estimula la diferenciación de las mismas hacia linaje osteoblástico⁵¹.

Sin embargo, se ha demostrado que el cocultivo con osteoblastos no es el único que induce la diferenciación de las células madre hacia osteoblastos. Partiendo del concepto de la osificación endocondral mediante la cual el tejido óseo definitivo pasa previamente por una fase cartilaginosa, se demostró que el cocultivo de células madre con **condrocitos** estimula también la diferenciación de las mismas hacia linajes osteoblásticos^{16,52,53}. En el estudio de Nurminskaya et al¹⁶ se observó como la transglutaminasa derivada de condrocitos ejercía una acción estimuladora de diferenciación de células madre hacia osteoblastos.

Además del cocultivo con condrocitos, se ha demostrado científicamente que el cocultivo con otros tipos diferentes de precursores celulares también estimula la diferenciación de células madre hacia osteoblastos. Según la bibliografía, los tipos celulares que tienen este efecto en cocultivo con células madre son:

- Células endoteliales vasculares⁵⁴.
- Células procedentes de la duramadre⁵⁵.
- Células inadherentes de la médula ósea⁵⁶.

Asimismo, se ha establecido que el cocultivo de células madre junto a osteoblastos totalmente diferenciados no estimula la diferenciación de las mismas⁵⁷.

5./ Radicales libres de oxígeno

Según la bibliografía, existe evidencia científica de que los radicales libres de oxígeno son mensajeros celulares importantes en el proceso de crecimiento y diferenciación celular⁵⁸. Asimismo, se ha observado que se libera una importante cantidad de radicales libres de oxígeno cuando se produce una lesión ósea traumática, lo cual parece indicar que éstos juegan un papel importante en la osificación que se produce después de una lesión ósea. Este hecho lo demuestra Chae, H. J. et al⁵⁹ en un estudio en el que evidencia como radicales libres de oxígeno generados por radiación ionizante tienen un efecto estimulante en la diferenciación hacia osteoblastos.

No obstante, existe controversia acerca de este factor, puesto que otros autores como Mody, N. et al⁶⁰ exponen resultados opuestos a los de Chae H. J. et al. en un estudio en el que muestra que el estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno producía un detrimento en la expresión de los marcadores de diferenciación de los progenitores osteoblásticos.

Dentro de los radicales libres de oxígeno, el papel del NO en el proceso de osteogénesis está ampliamente documentado en la bibliografía. Parece ser que el NO produce un efecto dosis-dependiente en la osteogénesis. En altas concentraciones, el NO produce un efecto inhibitorio de la reabsorción ósea, así como de la proliferación de osteoblastos. A niveles moderados de NO se ha observado que se estimula la reabsorción ósea, mientras que en presencia de NO en bajas concentraciones, se aprecia un aumento de la proliferación y diferenciación osteoblástica⁶¹.

6./ Estimulación física

Otro factor influyente en la diferenciación osteoblástica evaluado en la bibliografía es la aplicación de estímulos físicos a las células madre. Los estímulos físicos que más se han estudiado en la diferenciación de células madre hacia osteoblastos son:

- Aplicación de campos eléctricos y magnéticos. Se ha demostrado que frecuencias bajas de aplicación pulsátil de alrededor 15 Hz en células madre tienen un alto poder estimulante de la osteogénesis en comparación con frecuencias altas⁶². El máximo efecto estimulante se ha descrito en las etapas tempranas de diferenciación osteoblástica.
- Aplicación de calor. La aplicación de golpes de calor de alta temperatura ha demostrado ser un factor que estimula la diferenciación hacia osteoblastos⁶³.
- Aplicación de fuerzas mecánicas. Según la bibliografía, en ausencia de factores exógenos de crecimiento y de factores de diferenciación, estímulos mecánicos de forma aislada son capaces de inducir la diferenciación de células madre adultas hacia linaje celular osteoblástico⁶⁴.
- Aplicación de ultrasonidos. Los ultrasonidos de baja intensidad han demostrado tener un efecto positivo en la reparación ósea *in vivo*, además de efectos estimulantes de la diferenciación hacia osteoblastos en cultivos de células madre *in vitro*⁶⁵.
- Aplicación de láser. Existe evidencia científica de que la radiación generada

por láser aumenta la proliferación y la diferenciación de células madre hacia precursores osteoblásticos⁶⁶.

7./ Emparejamiento celular a través de formación de canales intercelulares (*gap junction*)

Una forma habitual de comunicación intercelular *in vivo* es estableciendo canales intercelulares. Estos son unos canales de pequeño tamaño, con un tamaño de poro de 1,5 nm aproximadamente entre el citoplasma de dos células adyacentes. Son técnicamente canales de membrana proteicos que regulan la transmisión de iones (moléculas de muy bajo peso molecular) entre dos células.

A través de estos canales se pueden transferir moléculas que son importantes para la diferenciación hacia osteoblastos. Se ha visto que los canales intercelulares establecidos por emparejamiento juegan un papel importante en la diferenciación osteogénica⁶⁷. Además Schiller et al evidenció que la inhibición de este tipo de canales mediada por el ácido 18- α -glicilrrretínico tenía como resultado la transdiferenciación de osteoblastos hacia linaje celular adiposo⁶⁸.

8./ Extractos citoplásmicos

Durante años se ha barajado la hipótesis de introducir extractos citoplásmicos de células maduras en células madre para lograr la diferenciación a dichas líneas celulares. Sin embargo, en la práctica se ha ido más allá logrando no solo la diferenciación de células indiferenciadas, sino la reprogramación de células ya diferenciadas hacia otro linaje celular totalmente diferente.

Håkkelien et al. consiguieron reprogramar células fibroblásticas para expresar células T y funciones neuronales mediante la exposición de extractos citoplásmicos de células T y progenitores neuronales a los fibroblastos⁶⁹. Los estudios acerca de la diferenciación hacia líneas celulares osteoblásticas son escasos, no obstante, se ha demostrado que las células autógenas de tejido adiposo pueden transdiferenciarse hacia osteoblastos^{9,10}.

9./ Factores genéticos

Una estrategia novedosa para dirigir y controlar la diferenciación osteogénica de células madre es a través de modulación genética. Esto consiste en transplantar células madre con ADN recombinado de tal manera que ya tengan expresados los genes que codifican para la fabricación de determinadas proteínas o factores de crecimiento que promueven diferenciación osteogénica. A este respecto son de particular interés los factores transcripcionales específicos de linaje osteoblástico, como son RUNX-2⁷⁰, Osterix⁷¹, Foxc1⁷², Msx2⁷², Alx4⁷² y dlx5⁷³. Todos ellos pueden ser considerados como "interruptores maestros" que controlan la expresión de una serie completa de proteínas específicas para la diferenciación de las células osteoblásticas. De todos ellos, el más estudiado es el gen RUNX-2, un homólogo de la proteína Runt de la drosófila, que sirve a su vez como regulador transcripcional temprano de la diferenciación osteoblástica en células indiferenciadas y como modulador de la osificación de osteoblastos ya diferenciados. Existe evidencia científica de que este factor transcripcional (RUNX-2), está en el

punto de convergencia de múltiples rutas para la regulación de la diferenciación osteoblástica⁷⁴. Además se ha demostrado una estrecha relación con la acción de la proteína morfogenética ósea (BMP). Debido a la importancia de este gen en concreto, se hablará de una forma más pormenorizada, revisando la bibliografía escrita al respecto más adelante.

10./ BMPs

Si bien es cierto que todos los factores enumerados en este trabajo se están estudiando por los investigadores y clínicos como estrategias para la osteodiferenciación de células madre, son las proteínas morfogenéticas (BMPs) las que experimental y clínicamente presentan más posibilidades de aplicación a corto plazo. Los resultados obtenidos en estudios *in vitro* e *in vivo* son muy prometedores, tanto en estudios donde se asocian a matrices aplicadas directamente a defectos óseos, como en aquellos donde se añadan directamente a cultivo de células madre para inducir la diferenciación a preosteoblastos y osteoblastos^{3,17}.

Las primeras evidencias sobre sus posibilidades osteoinductoras se deben a Urist et al (1965). Este autor demostró que extractos obtenidos a partir de la matriz orgánica del hueso eran capaces de formar hueso en tejido muscular. Las denominó proteínas morfogenéticas óseas desconociendo su estructura química y comportamiento fisiológico⁷⁵.

A partir de los extractos proteicos de hueso se identificaron en una primera etapa 15 proteínas BMP. Con la excepción de la BMP-1, todas ellas son citoquinas multifuncionales que se engloban en la superfamilia de las TGF- β . Algunas de ellas han demostrado capacidad osteoinductora^{21,76,78,80-83} y prácticamente todas participan en diferentes procesos del desarrollo, crecimiento, diferenciación y apoptosis celular⁷⁶⁻⁸¹.

Estructura química:

Las proteínas morfogenéticas se sintetizan como precursores de gran tamaño y la forma madura se libera mediante un proceso de proteólisis de la región propeptídica. La forma final activa de las BMPs, es un homodímero que presenta tres puentes disulfuro en cada monómero (intracatenarios) y un cuarto puente disulfuro uniendo ambas cadenas peptídicas (intercatenario). Esta estructura es similar a la encontrada en miembros de la superfamilia TGF- β , lo que ha hecho que algunos autores la denominen "la estructura básica del TGF/BMP".

" A finales de los años 80, las BMPs se aislaron y se secuenciaron, con lo que se abrió la puerta a su expresión mediante técnicas de DNA recombinante en diversos organismos modelos"^{82,83}.

BMP-2:

Es la proteína que presenta mayor capacidad de inducir la regeneración ósea y de formar hueso ectópico en vertebrados adultos, aunque su vida media en el organismo es muy corta. "Cuando se libera adecuadamente, resulta eficaz en la regeneración de tejido óseo"⁸¹.

La BMP-2 desencadena una respuesta celular al unirse a receptores de superficie. De esta manera incide en múltiples procesos celulares y altera la expresión génica. Estos cambios están relacionados con procesos de desarrollo embrionario o de diferenciación a tejidos mesenquimales, **mayoritariamente tejido óseo**.

En múltiples estudios *in vitro* se ha demostrado que la BMP-2 induce o aumenta los parámetros osteoblásticos de células multipotenciales, tanto en cultivos primarios, como en líneas celulares establecidas. Dentro de estos parámetros se incluyen la fosfatasa alcalina, asociada al inicio de la calcificación y marcador temprano de diferenciación ósea⁸⁴.

Obtención de la BMP-2:

La BMP-2 humana ha sido clonada, y actualmente se puede obtener de manera recombinante utilizando diferentes métodos de expresión (rhBMP-2). Los métodos de expresión descritos en la bibliografía para la obtención de la proteína son:

- Expresión de rhBMP-2 en células CHO de mamífero (Israel, Wozney, et al. 1991).
- Expresión de rhBMP-2 en células sf9 de insecto (Marouka, et al. 1995).
- Expresión de rhBMP-2 en E. Coli (bacteria) (Ruppert, et al. 1996).
- Expresión de rhBMP-2 en plantas de tabaco (Gao, et al. 2006).

Además de dichos métodos de utilización del recombinante clonado e introducido en los diversos organismos para su expresión, también se ha utilizado un método de obtención de BMP purificada de hueso para su uso clínico (Johnson, et al. 1992)⁸⁵⁻⁸⁹.

Actualmente, el método de obtención mediante purificación de hueso (aislamiento de BMP de hueso desmineralizado) se ha planteado como un método poco efectivo (se obtiene muy poca cantidad de proteína por cada kilogramo de hueso) y caro.

Los métodos más eficaces para la obtención de la proteína son la utilización de recombinantes en organismos que la expresen, sin embargo estos procedimientos requieren una serie de procesos de purificación y posterior activación (desnaturalización y aplicación de protocolos de plegamiento) de la proteína para que se pueda utilizar.

Actuación celular de la BMP-2 (ruta de señalización):

En lo referente a la ruta de señalización celular, las BMPs desarrollan su actividad biológica mediante su unión a **receptores de la superficie celular** (receptores serin-treonin-quinasas). Existen dos receptores conocidos: **BMPR-I** y **BMPR-II**. La unión de la BMP-2 se da inicialmente al BMPR-II y después al BMPR-I. Al unirse a los dos receptores se forma un complejo heteromérico estable. De esta manera, el receptor tipo II fosforila al receptor tipo I, que a su vez desencadena la fosforilación de las proteínas **Smad**.

La ruta de señalización intracelular Smad se considera la "vía canónica" de respuesta celular que regula la expresión transcripcional en respuesta a BMP-2.

Una vez que el BMPR-I fosforila a las R-Smad (receptor de membrana), éstas dimerizan en el citoplasma con una Co-Smad (mediadora). El complejo se transloca al núcleo y funciona como factor transcripcional, iniciando la expresión de genes de respuesta temprana a la BMP-2⁷⁸.

Resultados obtenidos con BMP-2 obtenida por cultivo de E. Coli:

La BMP-2 utilizada actualmente en investigación experimental y clínica se obtiene fundamentalmente por expresión de las células CHO de mamífero, siendo este método el utilizado por la compañía "GENETIC". Este método tiene el

inconveniente de su dificultad y sensibilidad en el proceso de obtención y, por tanto, su elevado coste.

Como alternativa se está utilizando BMP-2 recombinante (rhBMP-2) obtenida a partir de cultivos de *E. Coli* genéticamente modificados, tal y como han desarrollado el grupo de ingeniería tisular de la UCM dirigido por los doctores López Lacomba, Sanz Casado y Martínez Corriá.

La BMP-2 induce la diferenciación celular hacia fenotipo osteoblástico. En estudios "in vitro", utilizando células mioblásticas adultas de ratas (serie celular C2C12), es capaz de hacer que se transformen hacia células osteoblásticas produciendo modificaciones en su forma y haciendo que liberen fosfatasa alcalina al medio de cultivo, marcador específico de célula ósea¹².

La actividad de la enzima FA aumenta con la dosis de rhBMP-2 (comportamiento dosis-dependiente), alcanzándose la máxima respuesta celular con una concentración de 100 nm de rh-BMP-2. Resultado similar a otros estudios^{84,87}.

En estudios experimentales, se ha demostrado además de la activación de los procesos de diferenciación ósea, el efecto sobre la angiogénesis, éste último indispensable para la formación viable de tejido óseo. Ensayos preliminares muestran una mayor migración de células endoteliales en explantes de aorta cultivados con rhBMP-2⁹⁰⁻⁹².

De las diferentes isoformas de la proteína, se ha concluido científicamente que las isoformas BMP-2, -6 y -9 son las que más influyen en la osteodiferenciación de células madre somáticas de médula ósea²¹. Es interesante también recalcar que, a diferencia de las células madre procedentes de médula ósea, las células madre de origen embrionario no responden de la misma forma a la aplicación de la BMP. Las células madre de origen embrionario no son estimuladas para su diferenciación hacia linaje osteoblástico por la BMP. En vez de ello, ha sido demostrado que la BMP induce su diferenciación hacia células trofoblásticas, hematopoyéticas, condrogénicas e incluso cardiomiogénicas, mientras que no hay evidencia científica acerca de la utilización de BMP para la inducción de su diferenciación hacia linaje osteoblástico^{26,51,81,93-96}.

Por otro lado se observa la inactivación de los procesos relacionados con otros tejidos mesenquimáticos, como son el tejido muscular y el sistema nervioso.

Existen cambios drásticos en las células estudiadas como consecuencia del efecto morfodiferenciador de la rhBMP-2.

El tratamiento con rhBMP-2 induce la sobreexpresión de genes relacionados con la diferenciación ósea y la angiogénesis, mientras que los genes relacionados con la diferenciación mioblástica y neural están inhibidos¹⁷.

De forma paralela, se ha descubierto que en la acción de la BMP tiene un papel relevante el factor transcripcional RUNX-2.

11./ Gen RUNX-2

Si bien las BMPs actúan sobre receptores de membrana, existen dentro del citoplasma proteínas que suponen eslabones específicos de acción sobre el ADN celular. Eslabones sobre los que interactúan los mecanismos de acción intracelular

de las BMPs y cuyo conocimiento puede suponer nuevas vías en la investigación sobre la diferenciación dirigida de células madre hacia líneas osteoblásticas.

Una de estas proteínas es la RUNX-2 o CBFA1. La proteína RUNX-2 o CBFA1 (core-binding factor subunit alpha-1) es un factor de transcripción codificada en el ser humano por el gen RUNX-2, que cumple una función fundamental en la diferenciación osteoblástica y en la formación ósea.

Se ha descubierto que el gen RUNX-2 está regulado por el ciclo celular, y a su vez el gen regula el ciclo celular¹⁰⁴ ya que los niveles de expresión del gen alcanzan sus mayores niveles durante los periodos de inactividad y descienden drásticamente durante la etapa de proliferación celular, sin embargo, la actuación del gen sobre los promotores de los genes clave en todo momento, permite que continúe la determinación del linaje celular hacia osteoblastos sin interrupción¹¹⁵.

Además, el gen RUNX-2 está regulado por varios factores como: HES-1, Msx2, Dlx5 y proteínas TLE. Esto dificulta la tarea de determinar de forma experimental cuáles son los factores que más influyen en la expresión de este gen, ya que en los estudios es necesario realizar pruebas aisladas para cada uno de ellos y no se pueden valorar todos al mismo tiempo.

El gen RUNX-2 está asociado al mecanismo de acción de las BMPs. Al activarse los receptores transmembrana por un proceso de autofosforilación, se produce la fosforilación de la molécula Smad 1/5 que se asocia con la Smad4 y esta última, tras su traslocación al núcleo, es responsable de la interacción con el gen RUNX-2/Cbfa1/Osf2/AMLe que regula de forma positiva la expresión de factores osteoblásticos¹⁰¹ actuando sobre el ADN como se ha descrito anteriormente.

Una característica importante de la expresión de este gen es que codifica al menos dos isoformas de mRNA. Dependiendo del tipo que se codifique, se producirán dos tipos de proteína que difieren en su dominio amino terminal (tipo I y tipo II)¹¹¹.

Respecto a las alteraciones derivadas de las mutaciones en este gen, que demuestran su importancia capital en el correcto desarrollo óseo, se ha demostrado que la haploinsuficiencia del gen está asociada al desarrollo de la disostosis cleidocraneal y, en los ratones en los que se ha anulado la expresión de este gen, se ha observado la ausencia total de huesos¹¹⁰.

Estos hallazgos también son pruebas concluyentes en la importancia fundamental del gen RUNX-2 en la diferenciación osteoblástica puesto que la ausencia únicamente de este gen impide el correcto desarrollo óseo¹⁰⁷.

Todos los autores coinciden en la importancia de la expresión del gen para que se produzca la diferenciación osteoblástica^{97,98,101,109,110,111}.

Este gen actúa tanto en los procesos de transcripción, regulando la diferenciación osteoblástica como en la modulación de la formación de hueso actuando sobre los osteoblastos ya diferenciados¹⁰⁸.

Según T. Komori, la acción del RUNX-2 no es la misma durante los diferentes estadios de diferenciación: en una primera fase, sería el primer determinante para establecer una línea de maduración osteoblástica y, junto con el factor de transcripción Sp7/Osterix y Wnt, serían responsables de inhibir el proceso de diferenciación a condroblastos y adipocitos en las células implicadas. Después mantendrían a los osteoblastos en un estado inmaduro, durante el cual se produciría

hueso inmaduro con fibras colágenas desordenadas y escasa mineralización y por último, debería suprimirse para permitir la maduración final de los osteoblastos y la formación de hueso maduro^{99,100}.

En la tesis de K. Villegas sobre la caracterización de la expresión de RUNX-2, se recogen de forma similar las 3 fases de: proliferación, maduración de la matriz extracelular y mineralización de la matriz extracelular descritas por Lian y Stein^{112,113}.

Según C. Banerjee et al., existen dos isoformas del gen (tipo I/p56 y II/p57) que actúan de manera diferente según el estado de maduración de las células. Así el tipo I sería el responsable de la regulación celular en los estadios más tempranos, mientras que el tipo II intervendría mayoritariamente en los procesos de diferenciación, maduración y mantenimiento de las células osteoblásticas.

El tipo I del gen se encuentra en las células indiferenciadas que todavía no pertenecen al linaje óseo y su acción consiste en proporcionar a las células pluripotenciales la opción de seguir la vía mesenquimal, por lo que el tipo I estaría relacionado con las etapas más tempranas de la diferenciación y no obligatoriamente con la diferenciación osteoblástica, aunque su acción es igualmente necesaria.

Por otro lado, el tipo II se encuentra en mayor proporción en las células ya diferenciadas y está más relacionado con los cambios inducidos por la acción de las BMPs, lo que sugiere que es el tipo más importante en los procesos de diferenciación y maduración de las células osteoblásticas y actúa en procesos más tardíos que los controlados por el otro tipo I⁹⁸.

Esta explicación también es respaldada por Xiao y col. que observaron como la isoforma del tipo II se expresaba mínimamente en los estadios de proliferación mientras que aumentaba considerablemente durante las etapas de diferenciación y maduración¹¹¹.

Enomoto et al. que demuestra que este gen también es fundamental en la maduración de los condrocitos respaldado por los resultados observados en los ratones en los que se suprimió el gen¹¹⁴.

Es importante mencionar que el efecto de la expresión del gen ha sido evaluado de forma experimental sobre cultivos celulares o mediante su supresión en ratas tipo Whistar y, por tanto, existen otros muchos factores que podrían afectar a su interacción con el resto de factores de transcripción cuyo efecto no está completamente recogido en estos estudios.

X. Li et al. describen cómo el factor RUNX-2 está estrechamente regulado tanto a su nivel transcripcional y postranslacional; en este caso la proteína CHIP (C terminus of Hsc70-interacting protein) regula al gen RUNX-2 mediante un proceso de ubiquitinización.

De este modo, una sobre-expresión de la proteína CHIP en los pre-osteoblastos produce la degradación del RUNX-2, inhibiendo la diferenciación osteoblástica⁹⁷. Como esta, existen muchas regulaciones que afectan la actividad de RUNX-2, pero su evaluación debe hacerse de forma aislada para poder estudiar los efectos de cada una y, hasta el momento, no se han podido definir claramente la influencia de cada factor regulador y las interacciones que pueden darse entre ellos al actuar conjuntamente o en un medio natural.

A este respecto es importante destacar el artículo de Shui et al. en el que se estudió el efecto de RUNX-2 en células de médula ósea humana para contrastarla con los datos de los demás estudios que utilizaron, en la mayoría de los casos, células de rata tipo Whistar. Las conclusiones obtenidas apuntan que se observó claramente la intervención y la importancia del gen en la diferenciación osteoblástica pero que, a diferencia de los resultados obtenidos en células de roedores, esta diferenciación no se asocia a un aumento de síntesis de proteínas RUNX-2/Cbfa1 si no a un aumento en la actividad del gen, sin ningún cambio en los niveles de proteínas en el caso de las células de médula ósea humana¹⁰⁸.

Además de su efecto sobre las células mesenquimales indiferenciadas, también se ha descrito la capacidad del RUNX-2 para actuar sobre células mioblásticas primarias, revertiendo los procesos propios de esta línea celular y produciendo la expresión del fenotipo osteoblástico¹⁰¹.

En la mayoría de los estudios, se ha evaluado la acción del gen RUNX-2 como parte del conjunto de efectos producidos por la BMP-2, reconociéndose el papel fundamental del gen en la diferenciación osteoblástica, pero siempre condicionado a la acción de la BMP; sin embargo, en este estudio se demuestra la importante influencia que puede ejercer este gen por sí sólo sobre la diferenciación celular mediante la expresión directa del gen, sin intervención de los procesos desencadenados por la BMP-2.

Respecto a las alteraciones que producen las mutaciones en el gen, todos los artículos coinciden en que no es posible que se lleve a cabo un correcto desarrollo de los huesos puesto que, en todos los experimentos, se ha observado una débil mineralización en escasas localizaciones del esqueleto (debida a la acción de los condroblastos) y ausencia total de calcificación u osificación en el resto de los huesos¹⁰⁸.

VII. CONCLUSIÓN

Después de analizar la bibliografía acerca de las diferentes estrategias y utilización de factores para la diferenciación de células madre hacia osteoblastos se puede concluir que se están obteniendo por separado resultados muy prometedores. Lo cual, además, nos induce a pensar en una probable vía de investigación de factores combinados y no de forma aislada como se están analizando hasta ahora.

Dentro del ámbito de los factores de diferenciación, los que se han observado que presentan mejores resultados son los factores de crecimiento, y dentro de ellos concretamente la BMP. Es, además, este factor de crecimiento de vital importancia en este campo debido, no solo a los fantásticos resultados que arroja acerca de regeneración ósea, sino también por lo viable/tangible de su aplicación clínica futura.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Sanz Casado JV, Martínez Corría R, García Cantalejo JM, López Lacomba JL. Regeneración ósea. Tratado de cirugía oral y maxilofacial. Tomo II. Madrid (España): *Arán*; 2004: 549-558.
2. Donado M, Donado A, Guisado B, Ortega R, Sanz JV. Morfología ósea. Anatomía implantológica. Barcelona (España): *Ars Medica* 2003:9-45.
3. Heng B.C, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J. Bone Miner. Res* 2004; 19:1379-1394.
4. Nombela C. Células madre. Madrid: *EDAF* 2007.
5. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
6. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-González XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 25-27.
7. Goessler UR, Hormann K, Riedel F. Tissue engineering with adult stem cells in reconstructive surgery (review). *Int. J. Mol. Med* 2005; 15: 899-905.
8. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng* 2005; 11: 787-802.
9. Drago J, Samimi B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, Hedrick MH, Benhaim P. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* 2003; 85: 740-747.
10. Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, Laser J, Chen J, Kogon AJ, Nanda D, Grant RT, Breitbart AS. Biological alchemy: Engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 2003; 50:610-617.
11. Farré-Guasch et al. Buccal fat pad, an oral access source of human adipose stem cells with potential for osteochondral tissue engineering: an in vitro study. *Tissue Eng Part C Methods* 2010; 16 (5):1083-94.
12. Rauch C, Brunet AC, Deleule J, Farge E. C2C12 myoblast/ osteoblast transdifferentiation steps enhanced by epigenetic inhibition of BMP2 endocytosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: C235-C243.
13. Kroger H, Soppa E, Loveridge N. Growth hormone, osteoblasts, and marrow adipocytes: A case report. *Calcif Tissue Int* 1997; 61:33-35.
14. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 1999; 140:1630-1638.
15. Maeda S, Nobukuni T, Shimo-Onoda K, Hayashi K, Yone K, Komiya S, Inoue I. Sortilin is upregulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization. *J Cell Physiol* 2002; 193:73-79.
16. Nurminskaya M, Magee C, Faverman L, Linsenmayer TF. Chondrocyte-derived transglutaminase promotes maturation of preosteoblasts in periosteal bone. *Dev Biol* 2003; 263: 139-152.

17. Abarrategui A. Estudio del quitosano como biomaterial portador de rh BMP-2: desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo. [Tesis]. Madrid: *UCM Facultad de Ciencias Biológicas*; 2008.
18. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003; 24: 218–235.
19. Sykaras N, Opperman LA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): How do they function and what can they offer the clinician? *J Oral Sci* 2003; 45: 57–73.
20. Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 1842–1853.
21. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85:1544 –1552.
22. Raisz LG, Pilbeam CC, Fall PM. Prostaglandins: Mechanisms of action and regulation of production in bone. *Osteoporos Int* 1993; 3(Suppl 1): 136 –140.
23. Weinreb M, Grosskopf A, Shir N. The anabolic effect of PGE2 in rat bone marrow cultures is mediated via the EP4 receptor subtype. *Am J. Physiol* 1999; 276: E376–E383.
24. Van Leeuwen JP, van Driel M, van den Bermd GJ, Pols HA. Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2001;11:199–226.
25. Sottile V, Thomson A, McWhir J. In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. *Cloning Stem Cells* 2003; 5:149–155.
26. Zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 2003; 71:18 –27.
27. Notoya K, Nagai H, Oda T, Gotoh M, Hoshino T, Muranishi H, Taketomi S, Sohda T, Makino H. Enhancement of osteogenesis in vitro and in vivo by a novel osteoblast differentiation promoting compound, TAK-778. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290: 1054 -1064.
28. Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bonemorphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 688–692.
29. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 1992; 102: 341–351.
30. Kelly KA, Gimble JM. 1,25-Dihydroxy vitamin D3 inhibits adipocyte differentiation and gene expression in murine bone marrow stromal cell clones and primary cultures. *Endocrinology* 1998; 139: 2622–2628.
31. Rogers JJ, Young HE, Adkison LR, Lucas PA, Black AC Jr. Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesenchymal stem cells. *Am Surg* 1995; 61: 231–236.
32. Phillips BW, Belmonte N, Vernochet C, Ailhaud G, Dani C. Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 478–484.

33. Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, Shimokawa H, Kaibuchi K, Iwamoto Y, Takayanagi R. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 337–342.
34. Yang Z, Yu X, Huang F, Xie H. The influence of type I collagen on the cell behavior of human embryonic periosteous osteoblasts. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2001; 32: 1–4.
35. Wiesmann HP, Nazer N, Klatt C, Szuwart T, Meyer U. Bone tissue engineering by primary osteoblast-like cells in a monolayer system and 3-dimensional collagen gel. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 1455–1462.
36. Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, Li S. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 179–186.
37. Nakagawa T, Tagawa T. Ultrastructural study of direct bone formation induced by BMPs-collagen complex implanted into an ectopic site. *Oral Dis* 2000; 6: 172–179.
38. Weiss RE, Reddi AH. Synthesis and localization of fibronectin during collagenous matrix-mesenchymal cell interaction and differentiation of cartilage and bone in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 2074–2078.
39. Weiss RE, Reddi AH. Role of fibronectin in collagenous matrix-induced mesenchymal cell proliferation and differentiation in vivo. *Exp Cell Res* 1981; 133: 247–254.
40. Pilloni A, Bernard GW. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis in vitro. *Cell Tissue Res* 1998; 294: 323–333.
41. Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Qin L, Cheng JC, Kumta SM. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater Res* 2003; 66A: 880–884.
42. Takada T, Katagiri T, Ifuku M, Morimura N, Kobayashi M, Hasegawa K, Ogamoto A, Kamijo R. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 2003; 278: 43229–43235.
43. Olwin BB, Arthur K, Hannon K, Hein P, McFall A, Riley B, Szebenyi G, Zhou Z, Zuber ME, Rapraeger AC. Role of FGFs in skeletal muscle and limb development. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 90–100.
44. Grave B. Localization of TGF-Bs and perlecan in mouse skull development. *Ann R Australas Coll Dent Surg* 2000; 15: 352–356.
45. Toquet J, Rohanizadeh R, Guicheux J, Couillaud S, Passuti N, Daculsi G, Heymann D. Osteogenic potential in vitro of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. *J Biomed Mater Res* 1999; 44: 98–108.
46. Ohgushi H, Miyake J, Tateishi T. Mesenchymal stem cells and bioceramics: Strategies to regenerate the skeleton. *Novartis Found Symp* 2003; 249: 118–132.
47. Fischer EM, Layrolle P, Van Blitterswijk CA, De Bruijn JD. Bone formation by mesenchymal progenitor cells cultured on dense and microporous hydroxyapatite particles. *Tissue Eng* 2003; 9:1179–1188.

48. Dong J, Uemura T, Kikuchi M, Tanaka J, Tateishi T. Long-term durability of porous hydroxyapatite with low-pressure system to support osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 2002; 12: 203–209.
49. Spitzer RS, Perka C, Lindenhayn K, Zippel H. Matrix engineering for osteogenic differentiation of rabbit periosteal cells using alpha-tricalcium phosphate particles in a three-dimensional fibrin culture. *J Biomed Mater* 2002; Res 59: 690–696.
50. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg* 2003; 31: 27–33.
51. Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, Episkopou V, Polak JM. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* 2001; 7: 89–99.
52. Gerstenfeld LC, Cruceta J, Shea CM, Sampath K, Barnes GL, Einhorn TA. Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 2002; 7: 221–230.
53. Gerstenfeld LC, Barnes GL, Shea CM, Einhorn TA. Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment. *Connect Tissue Res* 2003; 44 (Suppl 1): 85–91.
54. Zhou J, Wu J, Tang R, Chen H. Research in use of vascular endothelial cells to promote osteogenesis of marrow stromal cells. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2003; 20: 447–450.
55. Spector JA, Greenwald JA, Warren SM, Bouletreau PJ, Crisera FE, Mehrara BJ, Longaker MT. Co-culture of osteoblasts with immature dural cells causes an increased rate and degree of osteoblast differentiation. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109: 631–644.
56. Aubin JE. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: Role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 1999; 72: 396–410.
57. Kim H, Lee JH, Suh H. Interaction of mesenchymal stem cells and osteoblasts for in vitro osteogenesis. *Yonsei Med J* 2003; 44: 187–197.
58. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001; 11: 173–186.
59. Chae HJ, Chae SW, Kang JS, Bang BG, Han JI, Moon SR, Park RK, So HS, Jee KS, Kim HM, Kim HR. Effect of ionizing radiation on the differentiation of ROS 17/2.8 osteoblasts through free radicals. *J Radiat Res* 1999; 40: 323–335.
60. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 509–519.
61. Evans DM, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 300–305.
62. Rubin CT, Donahue HJ, Rubin JE, McLeod KJ. Optimization of electric field parameters for the control of bone remodeling: Exploitation of an indigenous

mechanism for the prevention of osteopenia. *J Bone Miner Res* 1993; 8 (S2); S573–S581.

63. Shui C, Scutt A. Mild heat shock induces proliferation, alkaline phosphatase activity, and mineralization in human bone marrow stromal cells and Mg-63 cells in vitro. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 731–741.

64. Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PR, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J* 2002; 16: 270–272.

65. Machen MS, Tis JE, Inoue N, Meffert RH, Chao EY, McHale KA. The effect of low intensity pulsed ultrasound on regenerate bone in a less-than-rigid biomechanical environment. *Biomed Mater Eng* 2002; 12: 239–247.

66. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998; 22: 347–354.

67. Donahue HJ, Li Z, Zhou Z, Yellowley CE. Differentiation of human fetal osteoblastic cells and gap junctional intercellular communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C315–C322.

68. Schiller PC, D'Ippolito G, Brambilla R, Roos BA, Howard GA. Inhibition of gap-junctional communication induces the trans-differentiation of osteoblasts to an adipocytic phenotype in vitro. *J Biol Chem* 2001; 276: 14133–14138.

69. Håkkelien AM, Landsverk HB, Robl JM, Skålhegg BS, Collas P. Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 460–466.

70. Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, Olsen BR. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev* 2001; 106: 97–106.

71. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002; 108: 17–29.

72. Rice R, Rice DP, Olsen BR, Thesleff I. Progression of calvarial bone development requires Foxc1 regulation of Msx2 and Alx4. *Dev Biol* 2003; 262: 75–87.

73. Miyama K, Yamada G, Yamamoto TS, Takagi C, Miyado K, Sakai M, Ueno N, Shibuya H. A BMP-inducible gene, dlx5, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction. *Dev Biol* 1999; 208: 123–133.

74. Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E. Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res* 2003; 44 (Suppl 1): 109–116.

75. Urist M. R. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; vol. 150 (698): 893–9.

76. Rengachary S. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus* 2002; vol. 13 (6) e2.

77. Groeneveld et al. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000; vol. 142 (1) 9–21.

78. Wagner TU. Bone morphogenetic protein signaling in stem cells--one signal, many consequences. *FEBS J* 2007; vol. 274 (12) 2968–76.

79. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001; vol. 83-A: Suppl 1 (Pt 1) S1-6.
80. Solofomalala, G.D. et al. Bone morphogenetic proteins: from their discoveries till their clinical applications. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 2007; 17: 609-615.
81. Sykaras N et al. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J Oral Sci* 2003; vol. 45 (2): 57-73.
82. Sampath, T. K. et al. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; vol. 78 (12): 7599-603.
83. Rosen V et al. Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone. *Connect Tissue Res* 1989; vol. 20 (1-4): 313-9.
84. Katagiri T et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 1994; vol. 127 (6 Pt 1): 1755-66.
85. Israel DI et al. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors* 1992 vol. 7 (2): 139-50.
86. Maruoka Y et al. Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system. *Biochem Mol Biol Int* 1995; vol. 35 (5): 957-63.
87. Ruppert R et al. Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem* 1996; vol. 237 (1): 295-302.
88. Gao Y et al. Expression of human BMP-2 gene in different tissues of tobacco plants. *Yi Chuan Xue Bao* 2006; vol. 33 (1): 56-62.
89. Johnson E et al. Resistant nonunions and partial or complete segmental defects of long bones. Treatment with implants of a composite of human bone morphogenetic protein (BMP) and autolyzed, antigen-extracted, allogeneic (AAA) bone. *Clin Orthop Relat Res* 1992; (277): 229-37.
90. Vaes BL et al. Comprehensive microarray analysis of bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation resulting in the identification of novel markers for bone development. *J Bone Miner Res* 2002; vol. 17 (12): 2106-18.
91. De Jong DS et al. Identification of novel regulators associated with early-phase osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 2004; vol. 19 (6): 947-58.
92. Masson V et al. Mouse aortic ring assay: a new approach of the molecular genetics of angiogenesis. *Biol Proced Online* 2002; vol. 4 (4): 24-31.
93. Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, Zwaka TP, Thomson JA. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 1261-1264.
94. Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A, Bhatia M. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 2003; 102: 906-915.

95. Nakayama N, Duryea D, Manoukian R, Chow G, Han CY. Macroscopic cartilage formation with embryonic stem-cell-derived mesodermal progenitor cells. *J Cell Sci* 2003; 116: 2015–2028.
96. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Puceat M. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J* 2002; 16: 1558–1566.
97. Li X, Huang M, Zheng H, Wang Y, Ren F, Shang Y, Zhai Y et al. CHIP promotes Runx2 degradation and negatively regulates osteoblast differentiation. *J. Cell Biol* 2008; 181 (6): 959–972. doi:10.1083/jcb.200711044
98. Banerjee C, Javed A, Choi JY, Green J, Rosen V, Van Wijnen AJ, Stein JL et al. Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology* 2001; 142 (9): 4026–4039.
99. Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 2008; 13: 898–903.
100. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol* 2010; 658: 43–49. doi: 10.1007/978-1-4419-1050-9_5
101. Gersbach CA, Byers BA, Pavlath GK, García AJ. Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype. *Experimental cell research* 2004; 300(2): 406–417. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.07.031
102. Rada T, Reis RL, Gomes ME. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2009; 15(2): 113–125. doi: 10.1089/ten.teb.2008.0423
103. Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS, Halvorsen YD, Hitt DC, Cooper LF, Gimble JM. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue engineering* 2004, 10 (3-4): 371–380. doi: 10.1089/107632704323061735
104. Shen R, Wang X, Drissi H, Liu F, O'Keefe RJ, Chen D. Cyclin D1-Cdk4 induce Runx2 ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* 2006; 281: 16347–16353.
105. Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *Journal of pineal research* 2006; 40(4): 332–342. doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00318.x
106. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J. Biol. Chem* 1999; 274 (31): 22041–22047.
107. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine reviews* 2000; 21 (4): 393–411.
108. Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells Journal of bone and mineral research. *J Bone Miner Res* 2003; 18(2): 213–221. doi:10.1359/jbmr.2003.18.2.213
109. Villegas K. Caracterización de la expresión de Runx2 y Cbfb a través del ciclo celular, en células ROBmtert y MC3T3. [Tesis].

110. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Chimisu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89: 755–764.
111. Xiao ZS, Hinson TK, Quarles LD. *Cbfa1* isoform overexpression upregulates osteocalcin gene expression in non-osteoblastic and pre-osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 1999; 74: 596–605.
112. Lian JB, Stein GS 1999. The Cell of Bone 1999: In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism. Principles and Clinical Applications*. 2^a ed. San Diego: Academic Press; 2006.
113. Lian JB, Stein GS. Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. *Current Pharmaceutical Design* 2003; Vol. 9 (Issue 32): 2677.
114. Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, Kishimoto T et al. *Cbfa1* is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J. Biol. Chem* 2000; 275 (12): 8695–8702.
115. Young DW, Hassan MQ, Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Lee SH, Yang X, Xie R, Javed A, Underwood J, Furcinitti P, Imbalzano AN, Penman S, Nickerson JA, Montecino MA, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Stein GS. Mitotic occupancy and lineage-specific transcriptional control of rRNA genes by Runx2. *Nature* 2007; 445: 442-6.

DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL
Excmo. Dr. D. Antonio Bascones Martínez

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia,
Excmo. Sr. Secretario de la Comisión Gestora de la Academia de
Ciencias Odontológicas de España,
Excmo. Sras. y Sres. Académicos,
Señoras y Señores,

Tomo la palabra, una vez más, en nombre de la Academia, para presentar al profesor José Vicente Sanz Casado. Agradezco sinceramente a nuestra corporación que me haya elegido para contestar el discurso de entrada y, por supuesto, recibirle como es preceptivo. Este es un momento fundamental en su vida académica ya que entra a formar parte, en los albores de la Academia de Ciencias Odontológicas, de un grupo de académicos ilusionados con el proyecto. Conforme pasen los años será una realidad, importante, en este campo de la ciencia.

Hubo un tiempo en que el conocimiento era una virtud reservada para unos cuantos que manifestaban con sus expresiones holísticas una universalización de la cultura. En la misma persona se encerraba la filosofía, las artes como la arquitectura, la pintura y la escultura, la literatura, la ciencia y cualquier otro saber del momento. El Renacimiento tomaba, de esta manera, cuerpo de naturaleza en un mismo sujeto. Se trata de un movimiento cultural de la Europa Occidental, durante los siglos XV y XVI, a caballo entre la Edad Media y la Edad Moderna. La ciudad de Florencia, en Italia, fue el lugar de nacimiento y desarrollo de este movimiento y la Toscana, su área de expansión. En ella se asentaron celebridades que dieron impulso a las Artes y las Ciencias. Son las ideas del Humanismo, las que determinan una nueva concepción del hombre y del mundo. Se realizaba, de esta manera, la vuelta a los valores de la cultura grecolatina y a la contemplación de la naturaleza como forma de expresión. Una nueva etapa en la que pivota una manera diferente de ver el mundo y al ser humano, con otros enfoques en los campos de las artes, la política, la filosofía y las ciencias. Rompe, de esta forma, con la tradición artística medieval, a la que se calificó como un estilo de bárbaros. Históricamente, es contemporáneo de la era de los descubrimientos y las conquistas ultramarinas lo que deriva en una expansión mundial de la cultura europea, con los viajes portugueses y el descubrimiento de América. Esta es la Academia en un sentido amplio. Un lugar de encuentro.

Al presentar a un doctor, como el que tenemos ante nosotros, intentamos describir de la forma más adecuada las características que le hacen acreedor a un sillón en la Academia. Utilizaré, para ello, dos pinceladas alrededor de una personalidad académica: el hombre con su entorno y la universidad con su que-hacer. Ambas no se pueden desligar pues están agavilladas con un mismo cordel.

LA PERSONA

Nace nuestro nuevo Académico en la ciudad de Jaén, muy cerca de las emblemáticas ciudades de Úbeda y Baeza, donde cursa sus primeros estudios en el colegio de los Hermanos Maristas. Posteriormente se trasladó a Granada donde estudió Medicina y adquiere el grado de doctor en Medicina con la calificación de Sobresaliente cum laude. Poco después se traslada a la Universidad

Complutense donde realiza todo su trabajo académico y científico. *"Es Madrid, ciudad bravía / que entre antiguas y modernas / Tiene 300 tabernas / y una sola librería"*. Y nosotros, los madrileños, le recibimos con alegría y entusiasmo, no exentos de ilusión por lo que en aquellos momentos ya prometía. Persona cabal y prudente, en esta universidad desarrolla todo su quehacer científico, volcando su afán y labrándose un prestigio justo por su carácter y bonhomía, quizás por influencia de D. Antonio Machado que cerca de su casa vivió unos años. En esto, su bondad, estamos de acuerdo todos sus amigos e incluso sus enemigos que dudo que los tenga. Siempre está dispuesto a hacer favores, a ayudar a la gente, tratando que lo que le solicitan sea un favor que le hacen más que uno que hace él. El primer aire que respiró estaba impregnado de los poemas a los campos de olivos y a los recuerdos, sorianos, de sus olmos y álamos, de las riberas del Duero.

Junto a una gran persona hay una gran familia. Su esposa, Julia, médico-estomatólogo y sus dos hijos odontólogos están a su lado. Esto es una buena prueba de todo lo antedicho. Vaya mi felicitación para todos ellos.

Debemos tener en cuenta, que el maestro no solo debe entender sino también, tener generosidad, tolerancia y comprensión, pues generosidad es dar, tolerar es permitir, comprender es entender y entender es amar. El profesor conoce, sabe y enseña mientras que el maestro conoce, sabe, enseña y ama. Es decir, que el plano educativo de este último es superior pues hay ya un proyecto moral que es el que vehicula en su diario contacto. *"Quod natura non dat, Salmantica non præstat"*. Si entre los prosélitos no hay buen material, imposible será transmitir el conocimiento. El maestro da carta de naturaleza a un simple conocimiento frío y estático para transformarlo en dinámico, pues el conocimiento que no florece, y que solo impregna las cosas, no es vivo ni creativo. Toda transmisión debe ser dinámica y activa y, en ella, el sabio es el principal conductor. Es un escultor que cincela y esculpe la materia con el trabajo, la reflexión, la búsqueda de la excelencia. Trata de inculcarle una argamasa que le haga indemne a los avatares de la vida. El conocimiento que se transmite es aquel capaz de impulsar conocimiento.

La sabiduría se encuentra después de una vida plena y la plenitud de la vida es patrimonio de la vejez. *"Longa est vita, si plena est"* decía Séneca y es que la vida del anciano es un conjunto de serenidad, sensatez, tolerancia, generosidad, comprensión y aceptación lo que es el entramado necesario para que se incorpore el conocimiento y se llegue a la sabiduría. Nuestro hombre no ha llegado aún a este nivel, pero va camino de ello.

El viejo sabio posee la capacidad de enseñar lo que se debe hacer más que lo que se puede hacer y cómo hacerlo. La sociedad actual, tecnológica y del poder, camina hacia la imagen, consumo, prestigio, dinero y con ello pierde su libertad y por tanto su felicidad. Esta sociedad necesita el poder y la imagen del joven olvidándose del viejo, del Maestro como portador no solo de transmisión de conocimientos sino también de saberes y referentes morales.

El Maestro, pues, no solo debe transmitir sino también presentar un proyecto moral. El sabio cincela la personalidad del discípulo, esculpiendo, día a día, retazos de reflexión y conocimientos. Poco a poco va modelando una

personalidad basada en el intercambio bidireccional entre el maestro y el discípulo. Al fin, y a la postre, es un arquitecto del conocimiento, lo crea, lo innova, lo reflexiona y lo transmite.

LA UNIVERSIDAD

En la Universidad Complutense, en su Facultad de Medicina, ha ocupado todos los cargos posibles, desde secretario del Departamento de Anatomía y Embriología Humana, durante varios años, hasta el de secretario de la Facultad con diferentes decanos lo que demuestra su alto nivel de aceptación entre el profesorado de la facultad. Es profesor titular de Anatomía y Embriología. Terminó sus estudios de Odontología en la Universidad Complutense.

En la actualidad es director de un instituto universitario de donde han salido varias tesis bajo su dirección y donde realiza su actividad investigadora que han cristalizado en varios proyectos de investigación (Ministerio de Ciencia e Innovación, Fondo de Investigaciones científicas (FIS), Mutua Madrileña, Comunidad de Madrid...), así como cerca de 20 proyectos con entidades privadas que le han dado una financiación necesaria para llevar a todo su equipo a la producción de trabajos internacionales de impacto. Más de setenta publicaciones le avalan y treinta participaciones en congresos nacionales e internacionales. Últimamente es de destacar, a lo largo y ancho de la geografía española, su participación en cursos de la especialidad, concretamente en el campo de la Implantología. Ha participado en multitud de cursos que harían muy larga esta presentación. Me gustaría acotar un dato que le define de una manera precisa: no es raro encontrar muchos profesionales que desean hacer la tesis doctoral bajo su dirección. A la puerta de su despacho llaman pidiendo ayuda y consejo.

Por todo ello, y por mucho más, cuya pormenorización haría muy larga esta contestación, está avalado para ocupar un lugar señalado entre nosotros. No es mi deseo detallar toda su trayectoria científica sino simplemente presentar una fotografía de su persona y de su labor para que ustedes se hagan una idea de quien les presento.

COMENTARIOS A SU DISCURSO

Nos presenta el profesor Sanz Casado un interesante problema como es el de la **regeneración ósea, presente y futuro**. Es el caballo de batalla de la Implantología actual. Los defectos óseos de los maxilares constituyen un gran problema, que muchas veces hay que obviar, en las técnicas quirúrgicas. Por ello, la regeneración ósea nos ayuda a repararlos y a facilitarnos la colocación de los implantes. Es el hueso autólogo el que mejor nos sirve para conseguir una buena remodelación ósea. En cavidad oral se utiliza como donante la sínfisis mentoniana, trígono retromolar, rama de la mandíbula, tuberosidad del maxilar o el hueso cigoma. Otros lugares de donde podemos tomar hueso es la cresta ilíaca, calota craneana, costilla y tibia. Todo esto significa dos lugares quirúrgicos y las consiguientes molestas en la deambulación o el postoperatorio. Otro grupo importante de elementos utilizados para la reparación de defectos lo constituye el grupo de biomateriales. Se han usado osteoconductores como la

hidroxiapatita, fibrina, colágeno, fosfato tricálcico, sulfato cálcico, etc. Aplicados de forma aislada o combinados con hueso autólogo o heterólogo.

También se utilizan membranas reabsorbibles o no reabsorbibles aplicando los conceptos de regeneración ósea guiada para intentar regenerar hueso. Sin embargo, como dice nuestro nuevo Académico: "no se trata ya de "reparar" en el sentido clásico del término, sino de estimular los procesos de autorregeneración ósea existentes de forma natural en el hueso, facilitándolos, induciéndolos o incluso provocando su extensión a defectos de un tamaño superior al crítico, de forma que no sean necesarios tratamientos quirúrgicos sustitutorios".

Utilizando la combinación de células, matriz y factores de diferenciación se puede conseguir el objetivo de crear un tejido idéntico al original, tanto estructural como funcionalmente. Tenemos, entonces, la medicina regenerativa esto es la diferenciación de células madre hacia el linaje osteoblástico para su posterior uso en ingeniería de tejidos y cirugía reconstructiva. Ante nosotros se abre un campo inimaginable como es el de la osteoporosis y osteoartritis y el tratamiento de las lesiones óseas traumáticas, así como de los defectos óseos producidos por enfermedades congénitas o tumorales. Como muy bien señala nuestro receptor: "las células madre se distinguen de las células progenitoras por su capacidad de autorrenovación y de diferenciación en múltiples linajes celulares, mientras que las células progenitoras solo tienen capacidad de diferenciación a distintos linajes celulares, sin tener esa capacidad de autorrenovación. Es esta capacidad de autorrenovación la que hace a las células madre realmente útiles en medicina de trasplantes, puesto que de esta forma se puede proporcionar una inagotable fuente de material de trasplante".

En el periodo embrionario, las células pueden dirigirse hacia el ectodermo, endodermo y mesodermo. A partir del primero se forman las células del sistema nervioso y las de los tejidos epidérmicos. Del mesodermo derivan dos líneas fundamentales, la línea que genera células musculares (miocitos), de tejido graso (adipocitos), células de hueso y cartilago, y otras muchas integrantes de vísceras como el riñón. La otra es la línea que da lugar al sistema hematopoyético, en donde el sistema inmunitario tiene un gran protagonismo. Las células madre son células autorrenovables con capacidad de generar uno o más tipos celulares especializados. Indiferenciación y plasticidad son sus características definitorias como muy bien señala el Dr. Sanz Casado. Aunque las células madre de origen embrionario son las que mayor potencialidad tienen a la vez que capacidad de diferenciación, se ha demostrado que las células madre de organismo adulto son suficientemente potentes en términos de capacidad de diferenciación como para diferenciarse a linaje osteoblástico favoreciendo de esta manera la regeneración ósea.

Los factores de crecimiento pueden definirse como proteínas producidas por células, bien óseas (factores locales), bien extraóseas (factores sistémicos) que actúan modulando las funciones celulares, fundamentalmente la proliferación y diferenciación (son el factor de crecimiento insulínico, factor de crecimiento y transformación beta). Estas proteínas se sintetizan y se encuentran en plaquetas, macrófagos y osteoblastos. Tenemos también el factor de crecimiento derivado de plaquetas y que se encuentra implicado en prácticamente todos los procesos de recuperación de heridas.

Sin embargo, son las BMP (proteína morfogenética ósea) los factores de crecimiento que más atención han recibido en los últimos tiempos en relación con la regeneración ósea por su acción sobre células multipotentes e inmaduras, a la vez que estimulan su diferenciación a líneas osteoblásticas. Por todo ello son potentes osteoinductores y mineralizadores de tejido.

Concluye nuestro nuevo Académico que los mejores resultados que se obtienen son los relacionados con los factores de crecimiento, y especialmente con la BMP. La aplicación clínica futura es una realidad que nos hará cambiar nuestro enfoque técnico y quirúrgico consiguiendo una tasa de éxito más alta que la que tenemos en la actualidad.

Termino ya. Es un placer, para nuestra joven Academia, dar entrada al profesor José Vicente Sanz Casado por su brillante trayectoria en la Medicina y en la Odontología. No quiero acabar esta presentación sin añadir que en su trayectoria se condensa la vida académica, docencia e investigación, con la clínica diaria. Le deseamos una larga vida entre nosotros y deseamos, que este compromiso que adquieres, hoy día con la Academia, sea eterno, fructífero y placentero. Al final solo quedará lo bueno que hayas hecho y a los muchos que hayas dado ejemplo.

Y cuando llegue el día del último viaje,
y esté al partir la nave que nunca ha de tornar
me encontraréis a bordo ligero de equipaje,
casi desnudo, como los hijos de la mar.

He dicho.

