

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**REGENERACIÓN ÓSEA EN UN  
MODELO DE XENOTRASPLANTE DE  
CÉLULAS MADRE**

**Roberto González Alconada**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**D. JUAN FRANCISCO BLANCO BLANCO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo titulado "Regeneración ósea en un modelo de xenotrasplante de células madre" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. Roberto González Alconada en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de doctor de la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 2 de Marzo de 2015.

Fdo. Dr. D. Juan Francisco Blanco Blanco.



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**D. FERMÍN SANCHEZ-GUIJO MARTIN, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA  
POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y PROFESOR ASOCIADO DEL  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo titulado " Regeneración ósea en un modelo de xenotrasplante de células madre" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. Roberto González Alconada en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de doctor de la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 2 de Marzo de 2015.

Fdo. Dr. D. Fermín Sánchez-Guijo Martín



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**D. JESUS GARCÍA BRIÑÓN, DOCTOR EN BIOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo titulado "Regeneración ósea en un modelo de xenotrasplante de células madre" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. Roberto González Alconada en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de doctor de la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 2 de Marzo de 2015.

Fdo. Dr. D. Jesús García Briñón

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo:

Al Dr. Juan F. Blanco Blanco quien ha sido clave para el desarrollo intelectual y material de este proyecto, además de actuar como un verdadero tutor, animándome a continuar y contribuyendo a mi formación tanto profesional como humana.

Al Dr. Jesus García Briñón cuyo trabajo como anatomopatólogo en el presente proyecto ha permitido, sin duda, sacar unas valiosísimas conclusiones acerca de nuestro campo de estudio.

Al laboratorio de Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca, especialmente a las Dras. Consuelo Del Cañizo y Sandra Muntión y al Dr. Fermín Sánchez-Guijo Martín, co-director de esta tesis, por aportar sus esfuerzos en el campo de la biología celular de este trabajo doctoral.

A Sandra, por comprenderme y por animarme todos los días a seguir trabajando con ilusión, en este y en todos los aspectos de mi vida.

A mi padre, mi madre y mi hermana, por brindarme una oportunidad profesional incluso cuando no era posible, por inculcarme valores morales y humanos y por su incondicional apoyo.

A mi familia

## **ABREVIATURAS**



**APC: alofocianina**

**BMA: aspirado de médula ósea**

**BMP: proteína morfogenética ósea**

**BSU: unidad estructural elemental**

**CD: proteínas de membrana o clusters de diferenciación**

**CEIC: comité ético de investigación clínica**

**CMN: células mononucleadas**

**DBM: matriz ósea desmineralizada**

**DMEM: medio de expansión celular (Dubelcco's Modified Eagle's Medium)**

**ESC: células embrionarias pluripotenciales**

**FGF: factor de crecimiento fibroblástico**

**FITC: fluoresceína**

**G-CSF: factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos**

**GM-CSF: factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos**

**HA: hidroxapatita**

**HLA: complejo mayor de histocompatibilidad**

**HSC: célula madre hematopoyética**

**IFN: interferón**

**IGF: factor de crecimiento insulinoide**

**IL: interleucina**

**M-CSF: factor estimulante de crecimiento de colonias de macrófagos**

**MMA: metil metacrilato**

**MO: médula ósea**

**MSC: célula madre mesenquimal**

**NK: natural killer**

**PBS: solución salina fosfatada**

**PCy5: ficoetiricina-cianina-5**

**PDGF: factor de crecimiento plaquetario**

**PE: ficoetiricina**

**PerCP: clorofil peridina**

**PGA: ácido poliglicólico**

**PLA: ácido poliláctico**

**PLGA: ácido poliláctico-poliglicólico**

**PTH: parathormona**

**SBF: suero bovino fetal**

**TCP- $\beta$ : fosfato tricálcico beta**

**TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta**

**VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial**

**VHB: virus de la hepatitis B**

**VHC: virus de la hepatitis C**

**VIH: virus de la inmunodeficiencia humana**

## ÍNDICES

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1 Funciones del hueso</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 Composición del tejido óseo.</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2.1 Componente celular.</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2.2 Componente extracelular o matriz.</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2.2.1 Sustancia intercelular orgánica.</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2.2.2 Fracción inorgánica o componente mineral.</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3 Estructura ósea.</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3.1 Hueso compacto o cortical.</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3.2 Hueso esponjoso o trabecular.</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3.3 Periostio.</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4 Microscopía: variantes del tejido óseo.</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4.1 Hueso primario, inmaduro o plexiforme.</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4.2 Hueso secundario o maduro.</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5 Formación del hueso: osteogénesis u osteoformación.</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5.1 Osificación endomembranosa</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5.2 Osificación endocondral.</b> .....	<b>7</b>
<b>1.6 Modelado y remodelado óseo.</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6.1 Modelado óseo</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6.2 Remodelación ósea.</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6.2.1 Fase de activación.</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6.2.2 Fase de resorción.</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6.2.3 Fase de reversión</b> .....	<b>9</b>
<b>1.6.2.4 Fase de formación.</b> .....	<b>9</b>
<b>1.6.2.5 Fase de reposo.</b> .....	<b>9</b>
<b>1.6.3 Envejecimiento óseo.</b> .....	<b>9</b>
<b>1.7 Importancia de la regeneración ósea.</b> .....	<b>9</b>
<b>1.8 Tratamiento de los defectos óseos en la práctica clínica.</b> .....	<b>10</b>
<b>1.9 Ingeniería tisular ortopédica.</b> .....	<b>12</b>
<b>1.9.1 Concepto.</b> .....	<b>12</b>
<b>1.9.2 Consideraciones ortopédicas</b> .....	<b>13</b>
<b>1.9.3 Técnicas de andamiaje con biomateriales.</b> .....	<b>14</b>

1.9.4	Terapia celular e ingeniería tisular para reparación ósea.....	16
1.9.5	Factores de crecimiento y expresión génica. ....	17
1.9.6	Cultivo in vitro.....	18
1.9.7	Modelos in vivo y ensayos clínicos. ....	19
1.9.8	Vascularización del injerto. ....	20
1.9.8.1	Pre-vascularización in vivo. ....	20
1.9.8.2	Factores angiogénicos. ....	21
1.9.8.3	Pre-vascularización in vitro.....	21
1.10	Células madre. ....	22
1.10.1	Nicho de células madre: estructura y función.....	23
1.10.2	Células madre mesenquimales. ....	24
1.11	Biomateriales y sustitutos óseos. ....	26
1.11.1	Autoinjerto. ....	27
1.11.2	Alloinjerto.....	28
1.11.3	Biomateriales.....	31
1.11.3.1	Matriz ósea desmineralizada (DBM). ....	31
1.11.3.2	Colágeno.....	31
1.11.3.3	Sustitutos sintéticos.....	32
1.11.3.4	Cerámicas.....	32
1.11.3.5	HA coralina. ....	33
1.11.3.6	Injertos compuestos (biológicos/sintéticos). ....	33
1.11.4	Conclusión.....	34
2.	Hipótesis.....	36
3.	Objetivos .....	36
4.	Material y métodos .....	38
4.1	Obtención de las células mesenquimales .....	38
4.1.1	Pacientes.....	38
4.1.2	Aspirado de la cresta iliaca .....	38
4.1.3	Separación de las células mononucleadas.....	38
4.1.4	Aislamiento y expansión.....	39
4.1.5	Caracterización inmunofenotípica .....	40
4.1.6	Diferenciación multilineal de las MSC .....	42
4.2	Fosfato cálcico .....	44

4.3	Modelo animal .....	46
4.4	Análisis histológico .....	50
4.4.1	Análisis macroscópico.....	50
4.4.2	Análisis microscópico.....	50
4.4.2.1	Fijación de la muestra .....	50
4.4.2.2	Deshidratación .....	50
4.4.2.3	Infiltración.....	50
4.4.2.4	Polimerización.....	52
4.4.2.5	Preparación de la muestra incluida.....	53
4.4.2.6	Tinción. ....	54
4.4.2.7	Resultados.....	55
4.4.2.8	Obtención de las imágenes microscópicas.....	55
4.4.2.9	Inmunofluorescencia .....	55
5.	Resultados .....	59
5.1	Análisis macroscópico .....	59
5.2	Análisis anatomopatológico .....	59
5.2.1	Características generales de la tinción con azul de toluidina en animal control .....	59
5.2.2	Animales experimentales.....	60
5.2.3	Grupo tratado con TCP- $\beta$ .....	60
5.2.4	Animales tratados con TCP- $\beta$ y células madre humanas .....	66
6.	Discusión.....	75
6.1	Modelo animal. ....	75
6.2	Regeneración ósea y TCP- $\beta$ .....	75
6.3	Regeneración ósea y terapia celular. ....	77
6.4	Xenotrasplante y regeneración ósea.....	78
6.5	Nuestros resultados.....	79
6.6	Perspectivas de futuro de la ingeniería tisular.....	80
7.	Conclusiones. ....	83
7.1	Respecto a la hipótesis de trabajo. ....	83
7.2	Respecto a los objetivos del trabajo. ....	83
8.	Bibliografía .....	85

## INDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Esquema del nicho hematopoyético en la médula ósea. ....	24
Figura 2: Separación de células mononucleadas por gradiente de densidad.....	39
Figura 3: Aislamiento y expansión. ....	40
Figura 4: Células mesenquimales sobre el soporte o carrier.....	44
Figura 5: Visión microscópica de gránulos de Conduit (x50). ....	45
Figura 6: Visión microscópica con aumento x140. ....	45
Figura 7: Campo quirúrgico. ....	46
Figura 8: Defecto crítico .....	47
Figura 9: Implante del carrier y MSC en el cóndilo .....	48
Figura 10: Cierre completo .....	49
Figura 11: Características generales de la tinción con azul de toluidina..	60
Figura 12: Zona lesionada con depósitos de TCP.....	61
Figura 13: Fenómeno de lavado.....	61
Figura 14: Formación ósea sin integración del TCP. ....	62
Figura 15: Zonas de neoformación ósea.....	63
Figura 16: Cuerpos celulares en la zona de neoformación. ....	64
Figura 17: Laminillas óseas y cuerpos celulares. ....	65
Figura 18: Neoformación en el grupo de las células madre .....	66
Figura 19: Frentes de osificación. ....	67
Figura 20: Regeneración con pequeñas zonas de vacío. ....	68
Figura 21: Osteocitos en la zona de regeneración.....	69
Figura 22: Acúmulos de células no osteocitarias. ....	70
Figura 23: Osteocitos y células no osteocitarias. ....	71
Figura 24: Comparativa entre espécimen sin MSC añadidas y espécimen con MSC añadidas al carrier .....	72
Figura 25: Acúmulos de MSC humanas que pervivieron 12 semanas .....	73

## **INDICE DE TABLAS.**

<b>Tabla 1: Cualidades de los sustitutos óseos.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 2: Comparativa tipos de injerto .....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 3: Propiedades de los diferentes tipos de sustitutos .....</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 4: Anticuerpos monoclonales para el estudio del inmunofenotipo de las MSC .....</b>	<b>41</b>



## **INTRODUCCIÓN**

## **1. Introducción.**

### **1.1 Funciones del hueso.**

El hueso humano está constituido por un tejido peculiar que cumple una serie de funciones esenciales para la vida<sup>1,2</sup>:

- Protección de órganos y aparatos (tórax, pelvis, columna, cráneo).
- Sostén mecánico para dichos aparatos y sistemas.
- Función de movimiento: los huesos actúan como palancas sobre las que ejercen su acción los músculos.
- Función hematopoyética.
- Almacenamiento de minerales (calcio fundamentalmente).
- Regulación de la respuesta inmune.

### **1.2 Composición del tejido óseo.**

Existen dos elementos fundamentales que constituyen el tejido óseo:

- Componente celular.
- Componente extracelular o matriz, que a su vez se compone de fracción orgánica y fracción inorgánica o mineral.

En total, el componente orgánico del hueso supone el 30% del peso en seco del mismo. Dentro de él podemos incluir los elementos celulares (2%) y la fracción orgánica de la sustancia intercelular (98%)<sup>3,4</sup>.

#### **1.2.1 Componente celular.**

##### **A) Osteoblastos.**

Estas células derivan de una célula de origen mesenquimal llamada "preosteoblasto" que se halla en el periostio y el endostio. Su función principal consiste en producir hueso generando una sustancia osteoide<sup>5</sup> (matriz orgánica) que posteriormente se mineraliza. Los osteoblastos que quedan incluidos dentro de esta matriz mineralizada se transforman en osteocitos, los cuales tienen un protoplasma rico en fosfatasa alcalina. También intervienen en la regulación del proceso de resorción<sup>6</sup>.

### **B) Osteoclastos.**

Derivan de precursores hematopoyéticos que dan lugar también a los monocitos y macrófagos<sup>7</sup>. Son células redondeadas y voluminosas con numerosos núcleos (3-20). Tienen un protoplasma rico en fosfatasa ácida y colagenasa, las cuales son importantes para desempeñar una actividad catabólica<sup>8</sup>.

Los osteoclastos se encargan de destruir el tejido óseo en equilibrio con la formación de éste. Realizan esta función resorptiva en unas cavidades llamadas “lagunas de Howship”. Lo hacen bombeando protones y acidificando el medio para disolver el mineral y que las enzimas proteolíticas puedan degradar la matriz orgánica<sup>9</sup>.

Estas células son sensibles a la actuación de la PTH y la calcitonina por lo que intervienen en la regulación de la calcemia.

### **C) Osteocitos.**

Proceden de la transformación de algunos osteoblastos que quedan incluidos dentro de la matriz mineralizada y pierden parte de sus orgánulos.

Son las células maduras del tejido óseo y suponen el 90% de las células del hueso maduro<sup>8</sup>. Ocupan unas cavidades que les sirven de lecho llamadas “osteoplastos” o “lagunas osteocitarias”. De éstas salen los conductos calcóforos que son canalículos a través de los que los osteocitos extienden sus prolongaciones para conectarse entre sí y con células del ribete.

Los osteocitos intervienen sobre todo en la transmisión de señales mecanosensitivas y en el intercambio entre las células y el microambiente<sup>10</sup>.

### **D) Células del ribete.**

Revisten las superficies óseas en fase de reposo. Son células aplanadas cuya principal función es comunicar la superficie con los osteocitos y el microambiente.

## 1.2.2 Componente extracelular o matriz.

### 1.2.2.1 Sustancia intercelular orgánica.

Se constituye por un entramado proteico que representa el 98% del componente extracelular<sup>4</sup>. Distinguiremos dos grandes grupos de proteínas:

- Colágeno (90-95%).
- Proteínas no colágenas (5-10%).

#### **A) Colágeno.**

Es de tipo I y está constituido por dos cadenas de polipéptidos con posibilidad de mineralizarse.

Todas las fibras de colágeno de cada laminilla ósea se orientan de forma paralela aunque esta orientación varía de una laminilla a otra. Esto proporciona al hueso su estructura laminar junto con la resistencia a la tracción<sup>11</sup>.

#### **B) Proteínas no colágenas.**

Son sintetizadas por los osteoblastos. Una de las mas características es la “osteocalcina” que va ligada a la mineralización y se utiliza como marcador de la actividad osteoblástica.

El 1% de todas las proteínas no colágenas son los *factores de crecimiento* que actúan como principales reguladores del metabolismo de las células óseas<sup>12</sup>. Destacan entre estos factores:

- BMP
- TGF- $\beta$
- FGF
- PDGF
- IGF

Existen múltiples aplicaciones clínicas para estos factores<sup>13</sup>:

- Aceleración del proceso de consolidación ósea.
- Tratamiento de la pseudoartrosis.
- Tratamiento de defectos óseos.

Las BMP actúan favoreciendo la diferenciación de las células madre mesenquimales hacia osteoblastos o condroblastos<sup>14, 15</sup> y abundan en la fase precoz de la consolidación de las fracturas<sup>16, 17</sup>. Existen estudios acerca de la eficacia de la BMP-2 para acelerar la consolidación y disminuir la tasa de infección incluso en fracturas abiertas<sup>18</sup>.

### **C) Sustancia fundamental o amorfa.**

Rodea a las células y al sistema colágeno. Contiene proteoglicanos, mucopolisacáridos y glucoproteínas.

Los mucopolisacáridos se presentan en subunidades compuestas por moléculas de condroitín y keratán sulfato unidas a un núcleo proteico. Dichas subunidades se unen a su vez a una cadena central de ácido hialurónico<sup>19</sup>.

#### **1.2.2.2 Fracción inorgánica o componente mineral.**

La porción no orgánica de la matriz proporciona al hueso su resistencia y rigidez constituyendo además, una gran reserva de mineral. De hecho el 99% del calcio, el 85% de fósforo y el 40-60% del sodio y magnesio en el ser humano se hallan en el hueso en forma de cristales<sup>20</sup>.

La mayor parte del mineral óseo se encuentra en forma similar a la hidroxiapatita:

- 80% fosfato tricálcico.
- 10% carbonato cálcico.
- 10% impurezas.

Los cristales de HA tienen forma hexagonal aplanada y se rodean por una capa hidratante de agua e iones (sodio, cloro, potasio y magnesio) constituyendo una especie de cemento que rodea y se une a una serie de vigas formadas por las proteínas colágenas. Esta unión es lo que confiere al hueso sus propiedades mecánicas<sup>21</sup>.

### **1.3 Estructura ósea.**

De modo general los huesos se pueden clasificar por su forma o aspecto macroscópico, encontrando así huesos cortos, largos, planos e irregulares. En la mayoría de ellos se diferencia una zona externa compacta denominada cortical y una interna trabecular denominada esponjosa, tapizadas por tejido conjuntivo (periostio y endostio).

#### **1.3.1 Hueso compacto o cortical.**

El hueso cortical constituye cerca del 80% del esqueleto adulto y posee mayor densidad y menor porosidad que el hueso esponjoso. Se compone por la aposición de sistemas concéntricos de láminas en número de 8 a 15. Cada uno de esos sistemas recibe el nombre de “osteona o sistema haversiano”, el

cual es la unidad funcional fundamental del hueso cortical. En el centro de las osteonas se halla el “*conducto de Havers*”, por el que discurren los vasos y nervios. Dichos conductos se intercomunican a través de los “*conductos de Volkmann*”. Entre las propias osteonas existen mas sistemas laminares intersticiales.

Los osteocitos se hallan colocados sobre los sistemas haversianos y se intercomunican con los de su propio sistema estableciendo prolongaciones.

### **1.3.2 Hueso esponjoso o trabecular.**

Se constituye por una red tridimensional de trabéculas óseas que se orientan en función de las cargas que reciben, proporcionando la resistencia adecuada según las demandas funcionales.

El hueso esponjoso tiene un metabolismo 8 veces superior al del hueso cortical, reaccionando mucho mas rápido a los cambios en las cargas mecánicas que recibe.

### **1.3.3 Periostio.**

Es un elemento anatómico importante constituido por una capa de tejido conjuntivo que tapiza exteriormente los huesos, uniéndose a ellos a través de las fibras de Sharpey.

El periostio participa en el crecimiento a lo ancho del hueso y en el callo de fractura. Se encuentra muy desarrollado en individuos jóvenes, perdiendo grosor con la edad.

La superficie interna del hueso cortical también se halla tapizada por una capa de tejido conjuntivo que se denomina endostio y que es mucho menos activa que el periostio.

## **1.4 Microscopía: variantes del tejido óseo.**

### **1.4.1 Hueso primario, inmaduro o plexiforme.**

El tejido óseo se dispone de manera arbitraria<sup>1</sup>, sobre todo las fibras colágenas y no colágenas. Posee un mayor número de células y mayor contenido en agua, lo cual le hace más flexible y deformable<sup>17</sup>.

Este tipo de hueso abunda en el feto y el recién nacido, desapareciendo progresivamente hasta los 4 años. Posteriormente persisten restos de hueso inmaduro en inserciones tendinosas y ligamentarias, alveolos dentarios, suturas craneales y huesos del oído. También podemos encontrarlo en la

primera fase de formación del callo de fractura, en la enfermedad de Paget, osteogénesis imperfecta, hiperparatiroidismo y metástasis óseas.

#### **1.4.2 Hueso secundario o maduro.**

Organizado en sistemas laminares, en él, las fibras colágenas se ordenan en función de las cargas que soportan. En general se puede ver de forma sistemática en el esqueleto a partir de los 4 años.

### **1.5 Formación del hueso: osteogénesis u osteoformación.**

#### **1.5.1 Osificación endomembranosa.**

Afecta a un número reducido de huesos. Existe una producción “directa” de hueso sobre una membrana primitiva o maqueta mesenquimatosa<sup>19</sup>.

Comienza con un aumento de la vascularización en la zona central de la membrana. A continuación se genera una sustancia osteoide que se calcifica siguiendo un patrón centrífugo (Ej: bóveda craneal, maxilar inferior, clavícula).

#### **1.5.2 Osificación endocondral.**

Es el tipo de osificación de la mayor parte de los huesos del cuerpo. Sobre un molde mesenquimatoso previo existe una transformación a tejido cartilaginoso rodeado por pericondrio. En el centro de esta estructura, donde la osificación primaria comienza, los condrocitos se vuelven hipertróficos, mineralizan la matriz y se liberan señales para la migración de los condroclastos y formación de vasos sanguíneos (factor de crecimiento vascular endotelial).

Los vasos sanguíneos facilitan la llegada de células hematopoyéticas que interaccionan con el estroma formando la futura medula ósea. Las células del pericondrio responden a señales para convertirse en osteoblastos y producir una matriz rica en colágeno tipo I, formando un collarite alrededor de la estructura.

Posteriormente los condrocitos hipertróficos sufren una apoptosis y son reemplazados por osteoblastos, encargados de formar la matriz ósea. A continuación se desarrollan centros de osificación secundaria en las zonas distales de la estructura cartilaginosa, donde de nuevo los condrocitos dejan de proliferar, se hipertrofian y producen señales para la formación de vasos

sanguíneos y llegada de los osteoblastos. Entre medias de los centros de osificación primarios y secundarios, existen zonas de osteoblastos proliferando (conocidas como placas fisarias o de crecimiento) que permiten el crecimiento en longitud del hueso<sup>19, 22</sup>.

## **1.6 Modelado y remodelado óseo.**

### **1.6.1 Modelado óseo.**

Permite la formación ósea durante la vida embrionaria e infancia hasta la madurez esquelética, adquiriendo su forma definitiva. Consta de dos procesos: osificación endocondral y la membranosa.

### **1.6.2 Remodelación ósea.**

Es el proceso que sufre el hueso durante toda la vida y que permite conservar las propiedades mecánicas y la homeostasis mineral<sup>23-25</sup>.

La remodelación se hace a través de las unidades funcionales básicas del hueso:

- Osteonas (hueso cortical).
- Unidades estructurales elementales (BSU) en el hueso esponjoso.

En todo momento existe alrededor de un 5% de hueso cortical y un 20% de hueso esponjoso en proceso de remodelación. La duración media del proceso de remodelado completo son aproximadamente 4-6 meses y consta de diferentes fases<sup>26, 27</sup>.

#### **1.6.2.1 Fase de activación.**

La remodelación se inicia en zonas que se hallan en reposo, recubiertas por células del ribete. Dichas células son capaces de reaccionar ante señales de activación de tipo hormonal, mecánicas, etc.

La activación provoca una degradación de una fina capa de matriz no mineralizada situada justo debajo de las células del ribete. Esto permite que los osteoclastos entren en contacto con la matriz mineralizada<sup>28, 29</sup>.

#### **1.6.2.2 Fase de resorción.**

Se inicia con la diferenciación de precursores osteoclasticos que se transforman en osteoclastos maduros<sup>8</sup>. Estas células modulan su actividad en base a estímulos como estrógenos, PTH, citocinas<sup>6</sup>, etc.

Una vez adherido a la matriz mineral, el osteoclasto genera un microambiente ácido que disuelve la fracción inorgánica. Esto permite que el



arsenal enzimático del osteoclasto degrade la matriz orgánica<sup>30</sup>, obteniendo así una laguna de resorción llamada “laguna de Howship”. Esta fase dura unos 30 días<sup>27</sup>.

#### **1.6.2.3 Fase de reversión.**

Supone el acoplamiento entre la resorción y la formación ósea<sup>31</sup>. Durante 1-2 semanas se produce un reclutamiento de células osteoprogenitoras<sup>32</sup>. Se ha sugerido que durante la resorción se liberan factores estimuladores de la formación ósea incluidos en la matriz como el IGF, FGF, TGF-beta, BMP, PDGF<sup>33</sup>.

#### **1.6.2.4 Fase de formación.**

Se inicia con la proliferación de las células osteoprogenitoras que tapizan el fondo de las lagunas de Howship. Los osteoblastos inician la síntesis de la matriz ósea proteica (sustancia osteoide).

Aproximadamente a los 10-15 días después de este inicio, comienza la mineralización, mediante el depósito de cristales de HA en los espacios interfibrilares de colágeno. Esta fase dura unos 4-5 meses<sup>27</sup>.

#### **1.6.2.5 Fase de reposo.**

En esta fase los osteoblastos son sustituidos por las células del ribete que revestirán la superficie ósea hasta una nueva activación de los osteoclastos.

#### **1.6.3 Envejecimiento óseo.**

El equilibrio entre formación y resorción garantiza el mantenimiento de la masa ósea. Este equilibrio desaparece con el envejecimiento, debido a una disminución progresiva del grosor de las unidades estructurales elementales<sup>34</sup>,<sup>35</sup>. Durante la menopausia, la disminución de estrógenos provoca una aceleración en la remodelación ósea<sup>36</sup>. Este proceso hace que las trabéculas se adelgacen, deteriorándose la microarquitectura y aumentando el riesgo de fractura<sup>37-40</sup>.

#### **1.7 Importancia de la regeneración ósea.**

En la actualidad estamos asistiendo a un incremento considerable en la utilización de tejidos y células humanas en la práctica clínica habitual, además de en programas de investigación clínica. El tejido óseo es el segundo mas

trasplantado y junto con los derivados hematológicos son de lejos los más comunes.

Más de 500.000 procedimientos con injerto óseo se realizan anualmente en los Estados Unidos y aproximadamente 2.2 millones en todo el mundo con el fin de reparar defectos óseos en ortopedia, neurocirugía y odontología<sup>41</sup>.

El tratamiento de complicaciones secundarias a patología ósea postraumática como retardos de consolidación, pseudoartrosis o consolidaciones viciosas, suponen actualmente un reto para los profesionales sanitarios.

Las técnicas de regeneración ósea también son importantes en otros procedimientos como las fusiones espinales, tumores óseos o deformidades congénitas.

Actualmente el patrón oro en la terapia de los defectos óseos es la utilización de injerto corticoesponjoso autólogo de cresta iliaca. La obtención de este tipo de injerto se caracteriza por una disponibilidad limitada de hueso y la posibilidad de ocasionar morbilidad en el sitio donante. Estas circunstancias entre otras, han propiciado el desarrollo de nuevas técnicas de regeneración ósea a través de sustitutos naturales o sintéticos, moléculas inductoras y/o células con capacidad osteogénica como las células madre mesenquimales. Este enfoque ha contribuido en parte al desarrollo de la ingeniería tisular ortopédica<sup>42</sup>.

### **1.8 Tratamiento de los defectos óseos en la práctica clínica.**

En general el hueso presenta una gran capacidad para la curación, por lo tanto suele ser suficiente con obtener una alineación tolerable y una fijación estable a la hora de la reconstrucción ósea después de un traumatismo o una enfermedad. Incluso existen defectos óseos relativamente grandes que pueden ser reparados por mecanismos naturales, como el callo óseo o la producción de hueso inmaduro. El injerto o puenteado del defecto óseo puede realizarse de forma aguda (por ejemplo relleno del defecto mediante sustitutos óseos)<sup>43</sup>, o de forma continua mediante una distracción del callo con un alargamiento de la diáfisis<sup>44</sup>. Desafortunadamente estas técnicas de puenteo o relleno óseo están limitadas a determinados segmentos que permiten una fijación rígida y que presentan un adecuado aporte vascular. La mayor de sus desventajas son las

limitaciones técnicas y el elevado tiempo necesario para la formación de hueso estructural que permita la carga completa. Sin embargo en determinadas situaciones clínicas la reparación ósea natural puede ser demasiado lenta o inadecuada, por lo tanto se requiere algún tipo de técnica de reconstrucción<sup>45</sup>.

El hueso esponjoso se suele utilizar cuando existe únicamente necesidad de rellenar un defecto y permitir o favorecer la formación ósea. El hueso cortico-esponjoso en bloques se utiliza en los casos que precisan un soporte estructural. El hueso esponjoso autólogo presenta las mejores propiedades en cuanto a favorecer la formación ósea y además constituye un injerto seguro y barato de obtener, aunque presenta algunos inconvenientes como son la morbilidad de la zona donante y la disponibilidad limitada de stock óseo.

Un tipo especial de injerto estructural es el que se realiza con peroné vascularizado, y que requiere procedimientos de microcirugía para anastomosar los vasos. Este tipo de operación provoca una elevada morbilidad en el sitio donante, y su uso está limitado fundamentalmente a las reconstrucciones tumorales<sup>46</sup>. Una solución alternativa para el tratamiento de los defectos es el hueso homólogo de donantes humanos. En este caso todas las células del injerto son destruidas durante el procesado y almacenamiento en los bancos de hueso. Éste hecho reduce el riesgo de transmisión de enfermedades y reacciones inmunológicas. Sin embargo únicamente posee propiedades osteoconductoras y osteoinductoras, además de necesitar mayor tiempo para ser sustituido por hueso nativo comparado con el autoinjerto. Para solventar esta circunstancia se suelen mezclar ambos tipos de hueso y así mejorar la capacidad de formación ósea. Otra forma de disminuir el riesgo de transmisión de enfermedades es utilizar el hueso homólogo en forma de matriz ósea desmineralizada la cual presenta las mismas limitaciones de uso que la forma mineralizada.

La osteointegración y revascularización de grandes injertos corticales es limitada y frecuentemente se puede hallar como secuestros o fragmentos de hueso desvitalizado<sup>47</sup>.

## **1.9 Ingeniería tisular ortopédica.**

### **1.9.1 Concepto.**

La ingeniería tisular es un área de conocimiento que ha evolucionado mucho en los últimos años. Se han publicado éxitos en la obtención crecimiento in vitro de diferentes tejidos como hueso, cartílago, ligamentos, músculos y vasos sanguíneos. Estos logros son debidos a un enfoque multidisciplinar en el que tiene gran relevancia el rápido avance que ha experimentado la biología celular en los últimos años en cuanto al mejor conocimiento de las células madre y sus interacciones con el microambiente en el que se hallen. Uno de los objetivos claves de la ingeniería tisular ortopédica es favorecer o potenciar la diferenciación de las células madre hacia una línea osteogénica, para así dentro de un soporte tridimensional, obtener tejido óseo in vitro aplicable a la práctica clínica<sup>47</sup>.

La ingeniería tisular ortopédica trata de regenerar tejido óseo perdido a partir de traumatismos o enfermedades. Para lograr este objetivo se utilizan diferentes métodos y técnicas encaminadas hacia la regeneración de tejido óseo dinámico con sus diferentes tipos celulares, matriz extracelular y fracción mineral<sup>48</sup>.

Inicialmente, la respuesta celular ante los biomateriales utilizados es estudiada en medios de cultivo in vitro. Posteriormente se comprueba si existe regeneración satisfactoria en modelos in vivo, y por último se procede al estudio sobre humanos bajo una serie de condiciones éticas previamente fijadas<sup>49, 50</sup>.

Actualmente no existen guías aceptadas que recojan los requerimientos mínimos para la producción de sustitutos o injertos óseos. Esto es en parte por la gran variabilidad de materiales disponibles y de defectos óseos que se pueden presentar en la práctica clínica.

Hasta la actualidad, la ingeniería tisular se ha centrado fundamentalmente en conseguir injertos que promuevan la osteogénesis en el lugar del defecto óseo. Se pueden obtener dichos injertos de dos formas, bien mediante la implantación celular sobre estructuras biodegradables tridimensionales in vitro, o bien mediante el cultivo de tejido similar al hueso normal pero realizado in vitro. Se han empleado gran variedad de formas de

cultivo, utilizando señales bioquímicas (factores de crecimiento y citocinas) y sistemas de cultivo dinámicos (biorreactores). Estos sistemas favorecen el crecimiento tisular homogéneo mejorando el aporte de nutrientes (en ausencia de red vascular) y aportando estímulos mecánicos. Recientemente ha habido algunos intentos de obtención de hueso inmaduro o plexiforme junto con una red vascular que asegure la pervivencia de injertos voluminosos una vez implantados in vivo<sup>51, 52</sup>.

### 1.9.2 Consideraciones ortopédicas.

El objetivo fundamental de los profesionales implicados en la regeneración tisular ósea es la rehabilitación del paciente que ha sufrido una lesión o enfermedad. Para ello se pretende lograr un tejido con integridad estructural y un balance adecuado entre formación y reabsorción. En la práctica clínica ortopédica habitual nos encontramos a menudo con algunos problemas:

- El *aloinjerto* procedente de bancos de tejidos carece de células viables, presenta la posibilidad de transmisión de enfermedades o reacción inmune, aunque evita la extracción de hueso del propio paciente<sup>53, 54</sup>.
- El *injerto autólogo* presenta también limitaciones como la posibilidad de ocasionar morbilidad sobre el sitio donante y la cantidad limitada de hueso que se puede obtener<sup>55</sup>.
- La utilización de *injertos artificiales* como polímeros<sup>56-58</sup> o cerámicas<sup>48-50, 57</sup> presenta el problema de la carencia celular y un limitado soporte estructural.

El tratamiento quirúrgico de los defectos óseos utilizando auto y aloinjerto ha demostrado mejorar la capacidad de reparación de defectos óseos en mayor o menor medida. Aunque en la actualidad ninguno de los injertos utilizados presenta todas las características ideales: alto potencial osteoconductor y angiogénico, seguridad biológica, escasa morbilidad para el donante, diferentes tamaños, fácil acceso u obtención, durabilidad, bajo coste etc<sup>47, 59</sup>. Lo que la ingeniería tisular puede aportar en este sentido es combinar los avances en el campo de los biomateriales y de la biología celular, a fin de conseguir reunir la mayoría de estas características en un injerto<sup>60, 61</sup>.

El objetivo fundamental de la ingeniería tisular ortopédica es aportar un injerto que cumpla en la mayor medida posible las propiedades biomecánicas del hueso normal. Los tejidos obtenidos por ingeniería proporcionan las señales físicas y biológicas necesarias para estimular el remodelado óseo, encaminándose así hacia una integración y reemplazamiento por tejido nativo. Los injertos que presentan propiedades mecánicas adecuadas se pueden utilizar en sitios de carga, aunque también se pueden utilizar injertos con peores propiedades siempre que favorezcan la rápida formación de hueso mecánicamente competente. Debido a que el proceso de sustitución por hueso sano es bastante largo (1-2 años en ocasiones), se necesita un equilibrio perfecto entre la degradación progresiva de injerto y la construcción de hueso nativo<sup>52</sup>.

### **1.9.3 Técnicas de andamiaje con biomateriales.**

Los sistemas de andamiaje diseñados para regenerar tejidos deben cumplir una serie de características para ser útiles en la práctica<sup>49, 57, 58, 62</sup>. Deben ser biodegradables y biocompatibles, tener una resistencia mecánica adecuada y permitir un microambiente favorable para la regeneración de tejidos a través y alrededor de los mismos.

La eficacia de la regeneración tisular está relacionada con la estructura del injerto, influyendo la porosidad del mismo, el diámetro de poro, la interconectividad y la permeabilidad<sup>63</sup>. La rugosidad de la superficie del injerto y las propiedades químicas del mismo influyen en la capacidad de adherencia celular al mismo y en la expresión génica de dichas células.

Se ha investigado con una amplia gama de sustitutos naturales y sintéticos para lograr una regeneración ósea aplicable en la práctica clínica. Estos materiales se pueden dividir genéricamente en tres categorías: polímeros, cerámicas y materiales compuestos.

En los últimos tiempos se han introducido una nueva clase de materiales médicos denominados “polímeros degradables” como el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA), o la mezcla de ambos formando co-polímeros, etc. Una ventaja de estos materiales es que son capaces, en semanas o meses, de degradarse a dióxido de carbono y agua, permitiendo que los tejidos nativos rellenen el espacio que ocupaba el implante. Sin embargo, los

polímeros disponibles en la actualidad suelen perder fuerza antes de reabsorberse y de que comience el rellenado por tejido nativo y además desencadenan reacción inflamatoria local al degradarse<sup>64</sup>.

Existe una tendencia actual a diseñar injertos compuestos encaminados a mejorar las propiedades mecánicas<sup>64-73</sup> (como por ejemplo con las cerámicas) o para facilitar la liberación de factores de crecimiento con la degradación del material. En este sentido ha supuesto una notable mejora la adición de nanofibras de hidroxiapatita a un compuesto de fosfato tricálcico beta consiguiendo así un injerto con propiedades mecánicas mejoradas para huesos de carga<sup>69</sup>.

La función primaria de los injertos óseos es servir como vehículo conductor de la formación de nuevo hueso a partir del huésped. Como función añadida a ésta, es deseable que tengan una capacidad osteoinductora, liberando sustancias (BMP, TGF, IGF...) capaces de atraer células precursoras hacia el foco donde se pretende regenerar hueso. Se puede obtener una propiedad osteogénica sembrando el injerto con células, ya sean osteoblastos o células madre mesenquimales, capaces de producir nuevo hueso. Un buen injerto tridimensional debe favorecer la adherencia celular, el crecimiento, la diferenciación, la angiogénesis<sup>49</sup> y la osteointegración, siendo sustituido progresivamente por hueso del huésped<sup>74</sup>. Además debe adaptarse al contorno del defecto para cumplir la función mecánica requerida. Una situación a tener en cuenta es que dicho injerto debe ser capaz de mantener todas estas propiedades incluso después del proceso de esterilización<sup>75</sup>. Para lograr esto se puede realizar la mezcla del propio injerto con los factores de crecimiento y células en el propio foco.

La modificación de la morfología y propiedades químicas de la superficie de contacto de los materiales se ha mostrado efectiva a la hora de mejorar la biocompatibilidad. Se ha demostrado que un aumento en la microporosidad conlleva un descenso en la proliferación celular y un aumento en la diferenciación. La morfología de la superficie de contacto puede ser utilizada para inhibir la actividad osteoclástica<sup>76</sup>. Las superficies hidrofílicas y que contienen proteínas han demostrado que favorecen la adhesión y proliferación celular<sup>77, 78</sup>. Una de las formas más frecuentes para obtener estas propiedades es el tratamiento con gas plasma (oxígeno, helio y nitrógeno).

#### **1.9.4 Terapia celular e ingeniería tisular para reparación ósea.**

Aunque mas adelante se dedicará un capítulo para mejor conocimiento de las células madre mesenquimales, es importante mencionar en este apartado el rol que desempeñan las mismas dentro del marco de la ingeniería tisular.

Se pueden obtener células que favorezcan la regeneración ósea de diferentes fuentes como la médula ósea<sup>79</sup>, la sangre periférica<sup>80</sup>, tejido adiposo<sup>81</sup> y sangre de cordón umbilical<sup>82</sup>. Para aplicaciones en Cirugía Ortopédica, las células madre mesenquimales se pueden obtener a partir de la médula ósea y las células progenitoras de la capa más interna del periostio, además de las otras fuentes celulares indicadas. De forma alternativa también se pueden cultivar osteoblastos obtenidos a través de la médula ósea.

Se ha demostrado a través de ensayos clínicos que resulta eficaz la combinación de aspirado medular o cultivos de células progenitoras con polímeros biodegradables<sup>62</sup> o cerámicas<sup>57</sup> y con factores de crecimiento para obtener propiedades de osteoconducción junto con osteogénesis y osteoinducción en un injerto. Es importante conocer los genes, proteínas y moléculas secretadas por las células ya que pueden influir sobre el microambiente del injerto para inducir una adhesión, proliferación y diferenciación celular además de la producción de matriz ósea repercutiendo en la naturaleza del hueso regenerado<sup>83</sup>. Por ejemplo, el TGF- $\beta$  influye sobre la diferenciación osteoblástica in vivo y participa en la regulación del remodelado, la estructura y las propiedades biomecánicas del hueso<sup>84</sup>.

Conviene recordar que la edad es un factor relevante en la capacidad de regeneración ósea puesto que mientras los individuos más jóvenes poseen células madre mesenquimales en médula ósea en una proporción aproximada de 1:10.000, los individuos ancianos poseen una proporción menor (1:1.000.000)<sup>85</sup>.

Es ampliamente reconocida la necesidad de usar el fenotipo celular adecuado para la ingeniería tisular pero no siempre están bien definidas estas características fenotípicas. Para la regeneración ósea, las características deseables incluyen una alta actividad biosintética (crítica para el desarrollo e integración en el huésped), expresión de marcadores osteogénicos y



estabilidad fenotípica (no permitiendo el crecimiento de tejidos inespecíficos o no deseados).

#### **1.9.5 Factores de crecimiento y expresión génica.**

Se puede estimular el crecimiento de nuevo tejido a través de la liberación por parte del injerto de factores que promuevan la migración, proliferación y diferenciación celular<sup>86</sup>. Se han identificado numerosos factores capaces de participar en dicho proceso, como PDGF, IGF, TGF, BMP, IL, IFN y G-CSF<sup>14, 87</sup>. Generalmente los factores de crecimiento se pueden incorporar en el injerto, a fin de ser liberados en una zona concreta<sup>88</sup>, o formar una unión covalente con la superficie de contacto del injerto para mejorar la osteointegración. Para el tratamiento de problemas de consolidación de fracturas se ha diseñado una matriz compuesta de PLGA-HA capaz de liberar BMP2<sup>66</sup>.

Se ha demostrado crecimiento óseo evidente en defectos tibiales segmentarios a través del injerto con una matriz modificada por ingeniería genética<sup>89</sup> utilizando un vector plasmídico que codifica para proteínas que favorecen la regeneración ósea. Dicho vector codificaba para la producción de BMP2 y fue aplicado a una matriz de fosfato cálcico y colágeno, comparando los resultados con la utilización de la misma matriz sin el vector plasmídico. La matriz con activación génica se demostró superior en la regeneración ósea de defectos tibiales, comparando resultados radiológicos, histológicos y mecánicos. Se ha comprobado también la eficacia produciendo nuevo hueso, de un injerto compuesto por una matriz biodegradable de fumarato de polipropileno y TCP- $\beta$  con células a las cuales se aplica un vector que codifica para BMP7<sup>90</sup>.

En conclusión, existen evidencias que sugieren que la combinación de técnicas de diseño estructural de los injertos con técnicas de terapia génica proporcionan, en estudios in vivo, la mayor fuente de hueso entre los injertos o implantes evaluados<sup>91</sup>.

### 1.9.6 Cultivo in vitro.

El potencial para producir tejidos similares al hueso a partir de células madre mesenquimales fue ensayado primero en condiciones estáticas in vitro<sup>92, 93</sup>, evaluando diferentes parámetros como la densidad de siembra celular, propiedades del sistema de andamiaje, etc. Existen estudios en condiciones de cultivo estáticas con diferentes fuentes de células osteogénicas y materiales biodegradables incluyendo polímeros naturales y sintéticos<sup>94-98</sup>, cerámicas<sup>99</sup> e injertos compuestos<sup>95, 100-102</sup>. Estos estudios han revelado la importancia de los sistemas de andamiaje en 3D para favorecer la comunicación intercelular y estimular la osteogénesis, aunque también han puesto de manifiesto las desventajas de los sistemas de cultivo estáticos sobre todo en lo que a difusión de nutrientes y oxígeno se refiere.

Para lograr una proliferación celular homogénea y un crecimiento tisular en sistemas de andamiaje de gran tamaño se han desarrollado equipos de cultivo especiales llamados biorreactores. Éstos son conocidos genéricamente como dispositivos en los que se pueden controlar las condiciones de diferentes procesos biológicos y bioquímicos como por ejemplo la temperatura, el pH, la presión, el aporte de nutrientes y la eliminación de detritus<sup>103</sup>. La adición de células a un injerto estructural en condiciones estáticas tiene como resultado la distribución de dichas células por la periferia<sup>104</sup> influyendo así en la forma en la que el tejido se regenera. Para evitar este fenómeno se han introducido medios de cultivo dinámicos usando biorreactores de perfusión directa. De este modo se obtienen distribuciones celulares más homogéneas que cuando se realiza la mezcla agitando el contenido de un matraz aumentando así las interacciones célula/biomaterial<sup>105</sup>. El siguiente objetivo es la aplicación mecánica de cargas controladas sobre el injerto a fin de obtener una situación en la que la nutrición celular sea la adecuada<sup>103</sup>. La aplicación de una fuerza hidromecánica intermitente a un injerto de células estromales de línea osteoblástica de médula ósea implantadas en un soporte de fosfato cálcico, contenido todo ello en un sistema rotatorio, favorece la diferenciación celular y expresión precoz de marcadores osteoblásticos, especialmente la fosfatasa alcalina y el colágeno tipo I<sup>106</sup>.

Goldstein<sup>107</sup> comparó el crecimiento de células madre mesenquimales de médula ósea murina en 4 medios de cultivo diferentes. Concluyó que el crecimiento y distribución celular es más homogéneo en los biorreactores rotatorios que en otros medios de cultivo estáticos o matraz agitado. En un seguimiento a largo plazo<sup>108</sup> también observó que la formación ósea es mayor en los biorreactores. Diferentes estudios han demostrado también los efectos positivos de los medios de cultivo con flujo continuo para el crecimiento óseo *in vitro*<sup>109-115</sup>. Se piensa que el movimiento continuo de un medio líquido a través de los poros del injerto se aproxima al microambiente que existe en el hueso en condiciones normales. Mas recientemente se ha sugerido que una alta tasa de flujo junto con un diseño adecuado del recipiente pueden favorecer el desarrollo de grandes fragmentos, incluso preconformados, de tejido óseo *in vitro*<sup>116</sup>.

#### **1.9.7 Modelos *in vivo* y ensayos clínicos.**

Uno de los problemas de la ingeniería tisular es predecir la reproductibilidad *in vivo* de los resultados obtenidos *in vitro*. Para comprobar la capacidad osteogénica del injerto, éste se ha implantado en diferentes zonas entre las que se incluye tejido no óseo (por ejemplo en el tejido subcutáneo). Esto pretende evaluar la capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora del propio injerto implantado en un lugar donde recibirá señales sistémicas y vascularización procedente de los tejidos vecinos.

Para la evaluación de injertos compuestos con células madre humanas se han utilizado modelos animales murinos inmunodeprimidos principalmente<sup>117-120</sup>. Con esto se ha comprobado la capacidad osteogénica de este tipo de células interespecie y también se han observado diferencias en la formación ósea de dichas especies<sup>121</sup>.

La implantación de injertos en lecho óseo sea en zona de carga o no, también ha sido evaluada. Se ha encontrado que la maduración del injerto *in vitro* antes de su implantación arroja mejores resultados que la implantación sin células o con siembra de éstas en el momento de la misma<sup>97, 98</sup>. Asimismo se conoce que el número de células madre implantadas se correlaciona con el potencial osteoformador del injerto<sup>122</sup>. Esto podría ser utilizado en la práctica para predecir los resultados clínicos.

Una de las principales ventajas de utilizar ratones como modelo animal es el pequeño tamaño del defecto óseo por lo tanto del injerto necesario para el estudio (se puede producir *in vitro* fácilmente). Además se pueden utilizar células madre humanas. Los ensayos con animales de mayor tamaño se han realizado también con implantación en hueso, pero sin embargo se han limitado a la utilización de células autólogas de la misma especie animal.

Los ensayos en humanos en su mayoría se limitan a casos clínicos aislados y a pequeños ensayos fase I y II<sup>123, 124</sup> en los que se usan injertos obtenidos por ingeniería genética, habitualmente compuestos por cerámicas bioabsorbibles combinados con células madre obtenidas de médula ósea. Los resultados confirman la factibilidad y seguridad del procedimiento y la capacidad de integración de los injertos. Se prevé obtener mas información con ensayos clínicos aleatorizados (fase III).

#### **1.9.8 Vascularización del injerto.**

La vascularización después del implante es de vital importancia para la supervivencia, integración y funcionalidad del injerto<sup>125</sup>. En pequeñas distancias (menos de 200-300 micras) el aporte de oxígeno y nutrientes se puede realizar por difusión pero en caso de distancias mayores no es posible la supervivencia celular.

##### **1.9.8.1 Pre-vascularización *in vivo*.**

Los injertos óseos pueden ser implantados en zonas con un rico aporte vascular como el tejido subcutáneo, muscular o peritoneo donde pueden ser invadidos por una red vascular a través de su superficie de contacto. De todos modos, la trama vascular que se forma sigue un patrón desorganizado y es inevitable lesionarla al extraer el injerto para trasplantarlo al lugar de interés.

Se han intentado vías alternativas de pre-vascularización, por ejemplo utilizando un vaso sanguíneo (carótida, yugular, safena...) como eje central del injerto sembrado con células madre. De esta forma se produce una vascularización con neoformación ósea. Posteriormente se recupera el injerto vascularizado para implantarlo en el lugar definitivo<sup>126</sup>. También se ha intentado la vascularización configurando una fístula arteriovenosa en un modelo bovino donde se implanta el injerto sembrado. En este caso se observó mayor supervivencia de las células aunque no se obtuvo hueso neoformado<sup>127</sup>.

### **1.9.8.2 Factores angiogénicos.**

La vascularización de un injerto implantado se puede acelerar a través de la liberación local de factores angiogénicos (VEGF, FGF, PDGF)<sup>128</sup>. Estos pueden incorporarse al injerto de dos formas: mezclando los factores directamente con el polímero del injerto (liberación rápida), o bien encapsulándolos en microesferas que propician una liberación mas controlada<sup>129</sup>.

La liberación de VEGF en injertos de PLGA implantados en defectos craneales en modelo murino mostró un incremento en la vascularización y en la producción de tejido mineralizado<sup>130</sup>. La combinación de factores angiogénicos con factores osteoinductores (BMP4) y con células estromales de médula ósea es capaz de promover la osteogénesis en lugares ectópicos e incrementan la cantidad de hueso neoformado comparado con cualquiera de los factores solo o combinación de dos de ellos<sup>131</sup>.

### **1.9.8.3 Pre-vascularización in vitro.**

El cultivo in vitro de tejidos obtenidos por ingeniería genética con células osteogénicas y angiogénicas a la vez constituye una técnica con resultados esperanzadores<sup>132</sup>. Como fuente de células angiogénicas se pueden utilizar células endoteliales adultas, o como se ha sugerido mas recientemente, células madre mesenquimales<sup>133-135</sup>. Estas células generan una trama vascular dentro del injerto y tienen la capacidad de anastomosar estos vasos con los del huésped. Las células endoteliales no solo son importantes para la formación vascular sino también para la diferenciación e interacción con las células osteogénicas<sup>136</sup>. Se ha comprobado que el co-cultivo de ambos tipos celulares alarga la vida de las células endoteliales<sup>137</sup> y acelera la expresión de un fenotipo osteogénico en las células osteoprogenitoras<sup>138, 139</sup>. A pesar de ello algunos ensayos han informado de la posibilidad de que las células endoteliales puedan inhibir la diferenciación de las células madre mesenquimales a osteoblastos maduros<sup>140</sup>. Esto último puede deberse a las condiciones del cultivo o que los tipos celulares se hallasen en diferente estadio de maduración pero deja entrever que se necesitan más estudios para comprender mejor el funcionamiento del co-cultivo celular.

### 1.10 Células madre.

Existe cierta confusión a la hora de definir lo que es una célula madre, en parte debido a las referencias que se hacen en la literatura a la hora de describirlas. Se pueden encontrar términos como “inmortales”, “ilimitadas” o “capaces de proliferar de forma continua”<sup>141</sup>.

Las células madre son aquellas que tienen tres características fundamentales: a) Capacidad de proliferación, b) Capacidad de diferenciación hacia distintos tipos celulares y c) Capacidad de auto-renovación. Debido a éstas características, juegan un papel esencial en la organogénesis durante el crecimiento embrionario y en la regeneración tisular<sup>142</sup>.

Basándonos en la capacidad de diferenciación, es posible clasificar las células madre en los siguientes tipos<sup>143</sup>:

- Células totipotenciales: Pueden dar lugar a células de todos los tejidos embrionarios y la placenta. El cigoto es el mejor ejemplo.
- Células pluripotenciales: Pueden formar células de distintos tejidos embrionarios (ectodermo, endodermo y mesodermo). Las células madre embrionarias (ESC) son un ejemplo de este grupo.
- Células multipotenciales: Se diferencian únicamente hacia células de una única línea embrionaria o un tejido concreto. Ejemplos de este grupo son las células mesenquimales y la célula madre hematopoyética respectivamente

El uso terapéutico de las ESC es aún controvertido, no solo por los problemas éticos y legales<sup>144</sup> sino también por el desarrollo de neoplasias (teratomas)<sup>145</sup>.

A diferencia de ellas, las células madre adultas no producen teratomas y pueden obtenerse en cantidades adecuadas para la terapia regenerativa autóloga o alogénica. En contrapartida, estas células presentan una capacidad de diferenciación y proliferación limitada<sup>146</sup>.

Recientemente se ha producido un notable aumento en el interés científico por un tipo específico de célula madre que se halla en la médula ósea, denominada célula madre mesenquimal (MSC)<sup>147</sup> debido a sus propiedades únicas aplicables a la regeneración tisular y que conoceremos posteriormente.

### **1.10.1 Nicho de células madre: estructura y función.**

Normalmente las células madre adultas se hallan en un microambiente específico denominado “nicho”, el cual, juega un papel fundamental en la regulación del comportamiento de dichas células madre y la homeostasis de diversos tejidos.

En el caso de la médula ósea, el nicho hematopoyético contiene, entre otros tipos celulares, diferentes células de línea osteoblástica<sup>148</sup> en diferentes fases de desarrollo como preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos, junto con fibras de colágeno y depósitos minerales de calcio y fosfato<sup>149</sup>. Esta cavidad también contiene fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y adipocitos.

Hasta ahora se han identificado 2 tipos de nichos en la médula ósea, que intervienen en la regulación de las propiedades de las células madre hematopoyéticas<sup>150</sup>: el nicho osteoblástico y el nicho vascular<sup>151</sup>. Las células más diferenciadas se localizan en el nicho vascular, donde existe una mayor cantidad de oxígeno, que permite la diferenciación y la movilización celular hacia sangre periférica. Las células madre más indiferenciadas se encuentran cercanas al endostio, en contacto con los osteoblastos (nicho osteoblástico) y en una zona con menor presencia de oxígeno. Las señales producidas entre los osteoblastos y las células madre son cruciales en el mantenimiento y activación de éstas últimas<sup>149, 152, 153</sup>. Los osteoblastos producen citocinas que regulan la función de las células madre y entre ellas se encuentran el G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL1, IL6, etc<sup>148, 149</sup>.

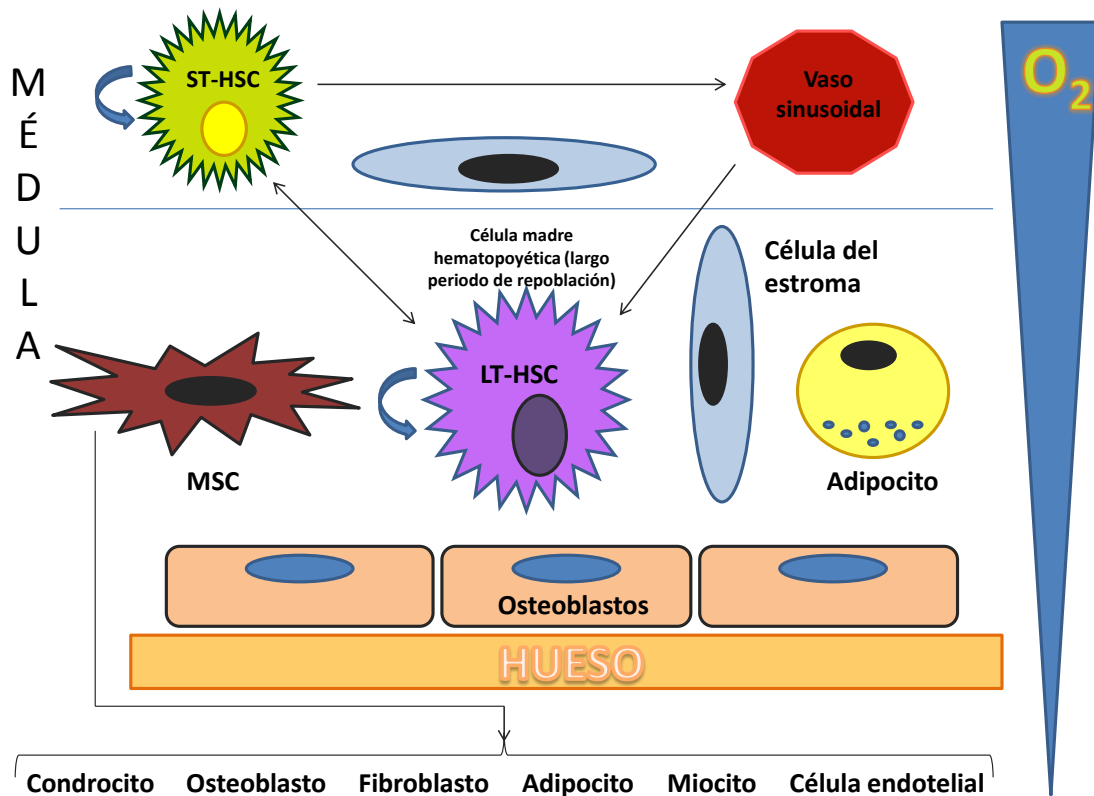


Figura 1: Esquema del nicho hematopoyético en la médula ósea.

### 1.10.2 Células madre mesenquimales.

Las células madre mesenquimales son las precursoras de la mayoría de las células que forman el nicho hematopoyético de la médula ósea. No sólo están presentes en la médula ósea, sino que existen células con características similares en otros tejidos y órganos como la placenta, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, músculo, hígado o pulmón entre otros<sup>154</sup>. Este tipo celular, durante los últimos años se ha convertido en objetivo de un gran interés científico debido a su capacidad para diferenciarse en células de estirpe mesodérmica, incluyendo fibroblastos, osteoblastos, condroblastos y adipocitos<sup>155</sup>. También ha generado importantes expectativas debido a su capacidad de expansión in vitro sin comprometer su estabilidad genética<sup>156</sup>. Además las MSC tienen una fuerte actividad inmunomoduladora in vivo e in vitro, siendo incluso células inmuno-privilegiadas<sup>157, 158</sup> ya que son capaces de escapar a la respuesta inmune del huésped. Esto parece ser debido a su escasa inmunogenicidad que obtiene a base de expresar unos niveles muy



bajos de moléculas tipo 2 del complejo mayor de histocompatibilidad. Las MSC no expresan moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 o CD86, las cuales están implicadas en la activación de los linfocitos T. Además, también liberan moléculas bioactivas que se ha demostrado que inhiben a los linfocitos T, B, células NK o células dendríticas derivadas de los monocitos, además de favorecer la expansión de linfocitos T reguladores<sup>159</sup>.

Para minimizar la creciente dificultad de comparar y contrastar los resultados de estudios, en 2006, el Comité de Células Madre Mesenquimales y Tisulares de la Sociedad Internacional de Terapia Celular propuso unos criterios mínimos para definir a las MSC basados en características fenotípicas y funcionales<sup>160</sup>:

- Deben mostrar adherencia a plásticos cuando son cultivadas in vitro en condiciones estándar.
- Han de ser negativas para marcadores hematopoyéticos: CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 $\alpha$  o CD19 y HLA tipo II, y deben ser positivas para los antígenos de superficie CD105, CD73 y CD90.
- Debe demostrar, en condiciones estándar in vitro, capacidad de diferenciación multilineal hacia osteocitos, adipocitos y condrocitos.

En el nicho medular las células estromales y la matriz extracelular proporcionan soporte estructural y funcional para acabar formando un sistema tridimensional donde se regula la proliferación, diferenciación y migración celular a través de interacciones célula-célula o célula-sustrato<sup>161</sup>.

Desde hace tiempo se han venido realizando estudios intentando imitar el microambiente de la médula ósea mediante sistemas de cultivo 3D<sup>162</sup>. Dicho intento se ha realizado añadiendo citocinas, factores de crecimiento y/o células estromales. Empleando sistemas de cultivo 3D se puede inducir un mayor contacto entre las células madre y las estromales, favoreciendo así un mayor crecimiento y capacidad de diferenciación celular en comparación con sistemas 2D<sup>163-166</sup>.

### 1.11 Biomateriales y sustitutos óseos.

Cuando existe la necesidad de rellenar y recuperar defectos óseos, el hueso autólogo se ha mostrado como el sustituto mas adecuado, aunque presenta una serie de inconvenientes que limitan su uso<sup>58</sup>. Es debido a esto por lo que se utilizan sustitutos<sup>164</sup>. Existen unas características fundamentales deseables para un sustituto ideal<sup>165, 166</sup>:

- Osteogénesis: se basa en la capacidad para producir nuevo hueso por lo que debe aportar células capaces de hacerlo.
- Osteoinducción: representa la estimulación y activación de las células progenitoras que pasan a ser osteoblastos y que es llevada a cabo por una serie de mediadores que pueden ser incorporados en un injerto o sustituto.
- Osteoconducción: es la propiedad de actuar como andamiaje o soporte para el crecimiento de capilares y la invasión por células osteoprogenitoras.
- Osteointegración: es la capacidad para quedar incluido formando parte del hueso nativo o huésped.

Existen además una serie de características deseables para los sustitutos óseos como biocompatibilidad, facilidad de uso, bioabsorbible, o coste-efectividad. Gran número de sustitutos óseos se comercializan en la actualidad. Varían en la composición, mecanismo de acción y en otras características especiales. La siguiente tabla clasifica diferentes sustitutos óseos en función de su cualidad predominante.

<b>OSTECONDUCCIÓN</b>	Cementos de fosfato cálcico Cerámicas Colágeno Polímeros sintéticos
<b>OSTEOINDUCCIÓN</b>	Matriz ósea desmineralizada (DBM) Proteínas morfogenéticas óseas (BMP) Factores de crecimiento
<b>OSTEOGÉNESIS</b>	Aspirado de médula ósea (BMA)

Tabla 1: Cualidades de los sustitutos óseos.

### 1.11.1 Autoinjerto.

El hueso autólogo es considerado el “gold estándar” en la reparación de defectos óseos ya que posee unas propiedades óptimas de osteoinducción, osteogénesis y osteoconducción<sup>166</sup>.

La cresta iliaca del paciente es el sitio donante mas utilizado ya que proporciona fácil acceso a un hueso esponjoso de calidad y en cantidades importantes. Por otro lado, la obtención de injerto autólogo y en particular de cresta iliaca, presenta una serie de desventajas como el alargamiento de la cirugía o la disponibilidad limitada de hueso. Este proceso puede producir una morbilidad en el sitio donante, habiéndose descrito complicaciones en el 8-20% de los casos<sup>167, 168, 169</sup>.

- Dolor crónico en la zona donante
- Fractura pélvica
- Lesión arterial o nerviosa
- Herniaciones
- Defectos estéticos

- Pérdida sanguínea excesiva
- Hematoma voluminoso
- Infección
- Lesión ureteral

A pesar de poseer óptimas condiciones como sustituto, el autoinjerto, puede fallar en la práctica clínica debido a que los elementos celulares no sobrevivan al proceso de trasplante.

### **1.11.2 Aloinjerto.**

El injerto heterólogo o aloinjerto, es habitualmente, la segunda opción mas elegida por los cirujanos para el relleno de defectos óseos. La mayor disponibilidad de este tipo de tejido, ha permitido la aparición de injertos preformados o customizados, como chips, tiras, etc.

El hueso heterólogo tiene mayores limitaciones en cuanto a las características esenciales, lo cual proporciona resultados clínicos variables. Lo podemos encontrar preparado de diferentes formas:

- Fresco: apenas se usa debido al riesgo de generar respuestas inmunes y transmitir enfermedades como el VIH, VHB, VHC, infecciones bacterianas, procesos malignos, o toxemias<sup>170</sup>.
- Congelado: el proceso de conservación estándar es de 1 año a -20°C y posteriormente 5 años a -70°C
- Congelado en seco o liofilizado: el procesado comienza con un doble lavado en una solución antibiótica. Se completa la esterilización con óxido de etileno o radiación gamma. Posteriormente se congela a -70°C y se deshidrata hasta el 5%. No se han detectado casos de transmisión de VIH con este tipo de injerto. Asimismo, es el menos inmunogénico de los 3 tipos de aloinjerto pero también es el menos osteogénico y osteoinductor y presenta las peores propiedades mecánicas. La rehidratación dentro del hueso del propio paciente ocasiona fracturas micro y macroscópicas con un descenso adicional de la fuerza de soporte de un 50%.

Debido al riesgo de transmisión de enfermedades, el aloinjerto se somete a una serie de procesos que pueden debilitar las propiedades biológicas y mecánicas iniciales. Durante este proceso, la congelación e irradiación eliminan el componente celular disminuyendo la inmunogenicidad y la capacidad osteogénica<sup>171, 172</sup>.

Actualmente la posibilidad de transmitir enfermedades virales es sensiblemente menor que con los hemoderivados, aunque se han descrito casos de VIH y VHC fundamentalmente. La probabilidad de contagio de VIH se estima en 1 caso por cada 1.6 millones, comparado con 1 por cada 450.000 en la trasfusión de derivados hematológicos<sup>173, 174, 175</sup>.

En la siguiente tabla se pueden observar una comparativa de las propiedades básicas de los tipos básicos de injerto<sup>176</sup>.

	Osteogénesis	Osteoinducción	Osteoconducción	Soporte estructural
<b>AUTOINJERTO ESPONJOSO</b>	+++	+++	+++	NO
<b>AUTOINJERTO CORTICAL</b>	++	++	++	+++
<b>ALOINJERTO ESPONJOSO</b>	NO	+	++	NO
<b>ALOINJERTO CORTICAL</b>	NO	NO	+	+++

Tabla 2: Comparativa tipos de injerto

<b>Material</b>	<b>Injerto</b>	<b>Osteoconducción</b>	<b>Osteoinducción</b>	<b>Osteogénesis</b>	<b>Ventajas</b>
<b>Hueso</b>	Autoinjerto	+++	++	++	Gold standard
	Alloinjerto	+++	+	-	Diferentes formas
<b>Biomateriales</b>	DBM	+	++	-	Suple a las BMP
	Colágeno	++	-	-	Vehículo formación ósea
<b>Cerámicas</b>	TCP/HA	+	-	-	Biocompatible
	Cemento fosfato cálcico	+	-	-	Soporte estructural
<b>Injertos compuestos</b>	TCP- $\beta$ BMA	+++	++	++	Amplio suministro
	BMP sintéticas	-	+++	-	Amplio suministro

Tabla 3: Propiedades de los diferentes tipos de sustitutos

### **1.11.3 Biomateriales.**

#### **1.11.3.1 Matriz ósea desmineralizada (DBM).**

Se puede obtener a través de la descalcificación de hueso cortical y posteriormente siendo procesada a fin de reducir la inmunogenicidad y riesgo de transmitir enfermedades.

La matriz ósea conserva el colágeno que forma parte de la estructura normal del hueso e incluso conserva parte de los factores de crecimiento, pudiendo ser más osteoinductor que el aloinjerto no desmineralizado<sup>177</sup>.

Aun así, los resultados clínicos no son uniformemente buenos, lo cual se atribuye parcialmente a las diferentes formas de procesar el DBM. Este se puede adquirir en diferentes formas como gel, pasta moldeable, tiras flexibles, cemento inyectable, etc.

A pesar de todo lo mencionado, el DBM se utiliza más como complemento del injerto que como sustituto propiamente dicho<sup>178, 179</sup>.

#### **1.11.3.2 Colágeno.**

La matriz ósea extracelular es rica en colágeno, el cual presenta una serie de propiedades<sup>180</sup>:

- Favorece la mineralización
- Promueve angiogénesis
- Producción de factores de crecimiento
- Ambiente favorable para la regeneración ósea

Uno de los principales problemas es que tiene cierto potencial inmunógeno y ofrece un soporte estructural mínimo.

El colágeno, de forma aislada, ofrece pobres resultados como injerto, aunque aumenta significativamente la incorporación de otro injerto cuando se utiliza conjuntamente con BMP, células osteoprogenitoras o HA. Habitualmente lo podemos encontrar como componente de otros sustitutos óseos (gel, gránulos, cerámicas de HA o TCP), y aunque solos han demostrado resultados poco consistentes, si son efectivos como complemento<sup>181, 182</sup>.

### 1.11.3.3 Sustitutos sintéticos.

En este campo se han producido considerables avances respecto a la pasada década, de modo que éstos materiales, podrían pronto alcanzar resultados comparables con el auto y el aloinjerto<sup>41</sup>.

Este tipo de materiales poseen al menos 2 de las características del injerto ideal: osteointegración y osteoconducción. Los sustitutos sintéticos, en condiciones ideales, deberían ser biocompatibles, producir mínima reacción fibrótica y permitir el remodelado junto a la formación de nuevo hueso.

Desde un punto de vista mecánico, deberían alcanzar la misma fuerza que el hueso cortical o esponjoso al que reemplaza, además de mantener un módulo de elasticidad similar, a fin de evitar una fractura por fatiga. Los compuestos que demostraron estas características, estaban formados básicamente por calcio, sílice o aluminio.

Las desventajas que presentan en la práctica clínica incluyen<sup>180, 183</sup>:

- Escasa y poco predecible reabsorción
- Dificultad de manipulación (HA coralina)
- Resultados clínicos pobres, con reacción inflamatoria ocasional tipo cuerpo extraño (polímeros degradables)

Estos inconvenientes podrían ser superados por los nuevos compuestos especiales de cerámica.

### 1.11.3.4 Cerámicas.

Son sustitutos sintéticos hechos a base de fosfato cálcico (TCP y HA principalmente). Se han venido utilizando en Ortopedia y Odontología desde la década de los 80.

Utilizadas de forma aislada, las cerámicas no poseen capacidad osteoinductora ni osteogénica. Suponen además un escaso soporte estructural.

Tanto el TCP como la HA pertenecen a este grupo aunque inducen un tipo de respuesta diferente en el huésped. El TCP poroso es reabsorbido por el foco a medida que el nuevo hueso crece, mientras que la HA permanece mas tiempo. La superficie de los sustitutos de TCP favorece la integración con el hueso huésped vecino y también la resorción y formación ósea<sup>184</sup>. La HA al tener una tasa de reabsorción mas lenta, puede generar focos de estrés



mecánico. Esta es una de las principales razones por la que estos materiales tienden a usarse de forma compuesta (HA+TCP o HA+hueso autólogo)<sup>185</sup>.

Una cerámica con elevada porosidad y baja densidad estructural proporciona un gran lecho para la angiogénesis y el crecimiento óseo. Aunque en principio carece de fuerza de soporte, progresivamente la va adquiriendo, a medida que se va rellenando de hueso esponjoso<sup>186</sup>.

El fosfato cálcico inyectable es una cerámica compuesta que actúa como cemento para rellenar defectos. Contiene TCP- $\alpha$  mezclado con carbonato cálcico y fosfato monocálcico monohidratado. Es preparado en forma líquida de manera que se puede inyectar en defectos óseos o fracturas, donde posteriormente fragua sin reacción exotérmica significativa. En ese momento el cemento ofrece una resistencia similar al hueso esponjoso normal. Posteriormente presenta un largo periodo de remodelado siendo en ocasiones completamente sustituido por hueso<sup>187</sup>.

El TCP- $\beta$  ultraporoso, fue diseñado imitando la estructura del hueso esponjoso y es otro sustituto cerámico compuesto por un 90% de "vacío" y por una estructura porosa que tiene orificios de 1-1000 micras (rango óptimo para osteoconductividad 150-500 micras). Esta porosidad favorece la actividad fagocítica y la infiltración por células osteoformadoras, nutrientes y factores de crecimiento<sup>188</sup>. Este sustituto está disponible en dos formas de presentación: gránulos y bloques.

#### **1.11.3.5 HA coralina.**

Deriva del coral marino, puede ser natural o sintética y está compuesta por una estructura porosa de fosfato cálcico similar al hueso esponjoso humano. Su propiedad fundamental es la osteoconducción. Presenta una resistencia elevada frente a la compresión pero baja frente a la tracción.

La HA coralina ha sido utilizada en el tratamiento de fracturas de meseta tibial como material para rellenar defectos, arrojando resultados comparables a los del hueso autólogo. Recientemente se ha usado como vehículo de algunos factores de crecimiento y BMP<sup>189</sup>.

#### **1.11.3.6 Injertos compuestos (biológicos/sintéticos).**

Una de las opciones quirúrgicas emergentes mas prometedoras es el uso de injertos compuestos que contengan células osteogénicas y factores de crecimiento (ej. BMP2 y BMP7) en una matriz sintética osteoconductora.

En ensayos preclínicos y clínicos realizados han arrojado resultados comparables con el alo y autoinjerto.

Estos compuestos, potencialmente, pueden proveer las 3 características fundamentales de los injertos óseos: osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción. Además lo hacen en condiciones ideales puesto que no presentan las desventajas de los autoinjertos.

Algunos ejemplos son:

- DBM/compuestos sintéticos
- TCP- $\beta$  ultraporoso/BMA
- Factores de crecimiento/compuestos sintéticos
- BMP/PLA o PGLA
- BMP/BMA/PGLA

#### **1.11.4 Conclusión.**

La terapia génica y la ingeniería tisular proveerán en un futuro, nuevos sustitutos que junto con factores de crecimiento, compondrán nuevos sustitutos biológicos. A éstos se les podrá incorporar células osteoprogenitoras, obteniendo así las mejores propiedades posibles para el tratamiento de defectos óseos.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **2. Hipótesis**

- El empleo de MSC humanas sobre un soporte de TCP- $\beta$  podría inducir la reparación de una lesión ósea crítica mediante regeneración en un modelo de xenotrasplante en conejos inmunocompetentes.

## **3. Objetivos**

- Analizar la viabilidad y el comportamiento de las MSC en un soporte de TCP.
- Evaluar macroscópicamente los efectos producidos por el implante de MSC y TCP- $\beta$  en lesiones óseas de tamaño crítico producidas artificialmente en cóndilo femoral de conejo.
- Examinar histológicamente los cóndilos femorales pasado un tiempo para comprobar la supervivencia, proliferación y diferenciación de las MSC en el nicho lesional.
- Estudiar comparativamente los resultados entre la aplicación de TCP- $\beta$  aislado o asociado a MSC.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **4. Material y métodos.**

El experimento consistió en provocar un defecto óseo irreparable “per se” en cóndilo femoral de conejo y añadir a dicho defecto TCP- $\beta$  junto con MSC humanas. En el fémur contralateral se realizó el mismo procedimiento pero sólo con TCP- $\beta$ , sirviendo como control. Posteriormente se realizó un análisis histológico y estadístico para comprobar la capacidad de regeneración ósea que se obtiene con esta técnica.

##### **4.1 Obtención de las células mesenquimales.**

###### **4.1.1 Pacientes.**

Todos los procedimientos se hicieron bajo aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario de Salamanca y de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2000, y con la obtención del consentimiento informado de cada paciente incluido en el estudio. Durante la intervención de cirugía espinal a la que fueron sometidos los pacientes se extrajeron 5 ml de médula ósea mediante aspirado de la cresta iliaca para la obtención posterior de las células mesenquimales.

###### **4.1.2 Aspirado de la cresta iliaca.**

La extracción de la médula ósea (MO) humana (5 mL) se realizó bajo anestesia general, durante la cirugía espinal de pacientes sometidos a una artrodesis vertebral, en los cuales de forma habitual se toma un aspirado de la cresta iliaca posterosuperior para su mezcla con un carrier y autoinjerto para obtener la fusión. Todas las intervenciones se realizaron en el Servicio de Traumatología del Hospital Universitario de Salamanca. Se utilizaron tubos estériles (Venoject; TerumetID) a los que se añadió heparina libre de aditivos (Heparina 5000U/ml; Seromed Biochrom KG), reconstituida con agua destilada (Vitulia estéril; Laboratorios ERN, Sal), para su transporte al laboratorio de Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca.

###### **4.1.3 Separación de las células mononucleadas.**

Tras aspirar la MO primero en jeringa con una aguja de 25G y después con otra aguja de 18G para asegurar la ausencia de coágulos y restos de

fibrina de la muestra, se procedió a la separación de las células mononucleadas (CMN) mediante centrifugación en gradiente de densidad.

Para ello se diluyó la muestra en medio Hanks (Gibco, Invitrogen) hasta tener un volumen de 12 mL y se homogeneizó. Esta dilución se añadió a dos tubos a los que previamente se había añadido 4mL de Ficoll-Hypaque (Biochrom KG, Berlín, Alemania) y se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos. Tras recuperar las CMN de la interfase se realizaron dos lavados con Hanks (10 minutos a 1200 rpm), y se resuspendió el botón celular en 1 mL de DMEM (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido), procediéndose al recuento celular en una cámara de Neubauer. (Figura 1).

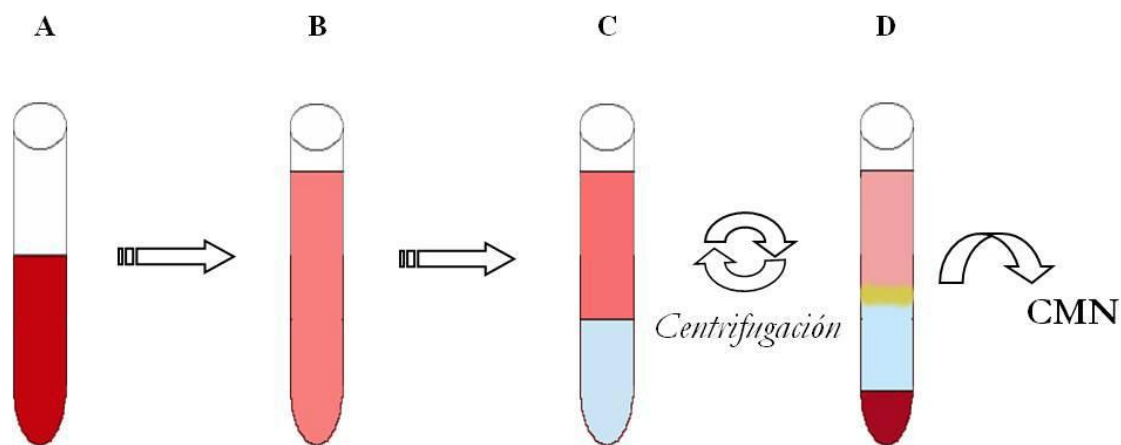


Figura 2: Separación de células mononucleadas por gradiente de densidad. A) Muestra MO. B) Dilución de la muestra con Hanks. C) Muestra diluida sobre Ficoll. D) Interfase en la que están presentes las CMN.

#### 4.1.4 Aislamiento y expansión.

Las CMN se plantaron a una concentración de  $10^6$  CMN/cm<sup>2</sup> en una placa de cultivo que contenía DMEM con 10% de suero bovino fetal (SBF; Bio Whittaker, Bélgica) y 1 % de penicilina-estreptomicina, y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se recambió 2 veces por semana (Figura 2).

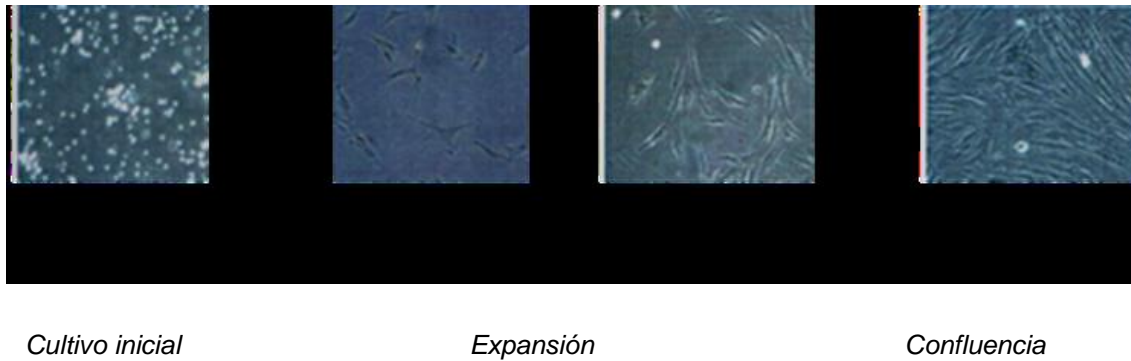


Figura 3: Aislamiento y expansión.

Tras alcanzar las células adherentes una confluencia mayor del 80% de la superficie de la placa de cultivo, se procedió a subcultivar nuevamente las células a una menor concentración en nuevas placas de cultivo. Este procedimiento se denomina "pase". Para realizar el pase del cultivo, se retiró el medio de expansión, se lavó con PBS y posteriormente se añadió la tripsina (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido) dejándola actuar de 6 a 8 minutos en el incubador a 37°C. A continuación se añadió medio con DMEM y 10% de SBF para neutralizar la acción tóxica de la tripsina, se recogió la suspensión celular obtenida y se centrifugó durante 10 minutos a 1200 rpm, decantándose el sobrenadante, y procediendo a contar las células resultantes, para proceder a replantar, esta vez (y también en pases sucesivos) a una concentración de  $2.5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. En todos los casos, las MSC se expandieron hasta el tercer pase antes de proceder a los estudios inmunofenotípicos y de diferenciación multilineal, y a los estudios experimentales en el modelo animal, pues en este momento la pureza del cultivo de MSC supera el 98%, pues las células hematopoyéticas residuales se han ido retirando con los sucesivos recambios del medio de expansión.

#### 4.1.5 Caracterización inmunofenotípica.

Tras el tercer pase, para la caracterización inmunofenotípica en el citómetro de flujo de las muestras obtenidas, los cultivos se tripsinizaron y se resuspendieron en PBS para el posterior marcaje con los anticuerpos monoclonales conjugados con los siguientes fluorocromos (Tabla 4) de



fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina-cianina-5(PCy5) y clorofil peridina (PerCP) o alofocianina (APC) según las siguientes combinaciones:

- CD90-FITC / CD73-PE / CD45-PCy5 / CD34-APC
- CD105-FITC / CD166-PE / HLAOR-PerCP / CD19-APC
- CD14-FITC / CD106-PE / CD45-PCy5
- Control isotópico

Los anticuerpos monoclonales empleados se obtuvieron de Becton-Dickinson-Bioscience (BDB; San José, USA), salvo el C0105-FITC, que se adquirió a InmunoStep (Salamanca, España). Tras incubación a temperatura ambiente 15 minutos en oscuridad, se retiró el exceso de anticuerpo lavando con PBS. El botón obtenido fue resuspendido en 0.5ml de PBS, y la muestra fue adquirida en un citómetro de flujo FACSCalibur (BDB) con longitud de onda de 488nm, calibrado y compensado específicamente para el estudio de las MSC.

	FLUOROCROMO	CLON	ISOTIPO	CANTIDAD CEL/10 <sup>6</sup>
CD 14	FITC	M5E2	Mouse IgG <sub>2b</sub> K	10 IJL
CD90	FITC	5E10	Mouse IgG <sub>1</sub> K	2 IJL
CD105	FITC	2H6F11	Mouse IgG <sub>1</sub>	10 IJL
CD73	PE	AD2	Mouse IgG <sub>1</sub> K	10 IJL
CD106	PE	51-10C9	Mouse IgG <sub>1</sub> K	10 IJL
CD166	PE	3A6	Mouse IgG <sub>1</sub> K	10 IJL
CD45	PE-Cy5	HI30	Mouse IgG <sub>1</sub> K	10 IJL
HLA-DR	PerCP Cy5.5	L243	Mouse IgG <sub>23</sub> K	10 IJL
CD19	APC	HIB19	Mouse IgG <sub>1</sub> K	3 IJL
CD34	APC	581	Mouse IgG <sub>1</sub> K	3 IJL

Tabla 4: Anticuerpos monoclonales para el estudio del inmunofenotipo de las MSC

Se adquirieron al menos  $10^5$  células por cada muestra. La adquisición se realizó utilizando el programa CellQuest y el análisis empleando el programa Paint-a-Gate Pro, ambos de Becton-Dickinson-Biosciences (BDB). Para cada antígeno se calculó el cociente entre de la intensidad media de fluorescencia (MFI, del inglés "Mean Fluorescence Intensity") para ese antígeno y la intensidad del control isotópico correspondiente.

#### **4.1.6 Diferenciación multilineal de las MSC.**

Con el objetivo de demostrar la capacidad de diferenciación de las MSC del aspirado medular en cresta ilíaca se indujo su diferenciación in vitro hacia condrocito, osteocito y adipocito según los métodos que se resumen a continuación.

De cada muestra se sembraron 4 placas de cultivo de  $9,6 \text{ cm}^2$  de superficie de tipo "slide flask" (Nunc, Dinamarca), a razón de  $5 \times 10^3$  células/  $\text{cm}^2$  incubándose hasta obtener una confluencia del 80%. De estas 4 placas, 2 se usaron para la diferenciación adipocito y 2 para la de osteocito.

En el caso de la diferenciación a osteocito se incubaron con medio de diferenciación específico (NH Osteodiff Medium, Miltenyi Biotec, Alemania), recambiando el medio cada 3-4 días. Transcurridos 10 días se lavaron los cultivos con PBS y se fijaron con una solución de etanol frío al 70% durante 10 minutos. Tras lavarlas con PBS, se incubaron durante 20-30 minutos con 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato nitro azul de tetrazolio (BCIPNBT, Sigma-Aldrich) en agitación. Para mejorar la visualización se contrastaron con 1 mL de hematoxilina durante 2 minutos.

Para la diferenciación a adipocito, las muestras se incubaron con medio de diferenciación NH Adipodiff Medium (Miltenyi Biotec, Alemania), en las mismas condiciones ( $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ ) durante 21 días. Para la tinción con oil-red-o, se retiró el medio de diferenciación y se fijaron las muestras con formaldehído al 3.7% durante 2 minutos. Después se añadió 1ml de solución de oil-red-o (Merck, Darmstadt, Alemania), y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación lenta.

En ambos casos se mantuvo una "slide flask" con MSC únicamente con medio de expansión (DMEM con 10% SBF) y sin medio de diferenciación

específico en las mismas condiciones, que sirvió de control negativo de la diferenciación a osteoblasto y adipocito. Todas las muestras se lavaron y prepararon para su visualización en el microscopio óptico. En este caso utilizamos un microscopio Olympus BX41 utilizando el programa Micro DP70 controller and manager software pack (Olympus Optical, Barcelona, España).

Para la diferenciación condrogénica,  $5 \times 10^5$  células en pase 3 se centrifugaron en un tubo Falcon cónico de polipropileno de 15 mL (BDB). El botón obtenido se cultivó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en 500 microlitros de medio de diferenciación condrogénico (NH Chondrodiff Medium, Miltenyi Biotec, Alemania), siguiendo el protocolo correspondiente que acompaña al producto. El medio se cambió cada 3-4 días y tras 21 días de cultivo los botones celulares se incluyeron en parafina, para ser cortados en secciones de 5 mm de grosor. Para el análisis de los cortes, éstos se marcaron con anticuerpos monoclonales de ratón anti-colágeno tipo II humano (Chemicon International, Alemania) seguido de incubación con anticuerpos conjugados conCy2 (Jackson Immunoresearch Europe. Ud., Suffolk, Reino Unido). El análisis de la muestra se realizó en un microscopio de fluorescencia Olympus Provis equipado con epifluorescencia y con los filtros correspondientes (Olympus Europe GmbH, Hamburg, Alemania). Las imágenes se tomaron con una cámara digital Olympus Optical CO, GmbH, Hamburg, Alemania), adaptada al ordenador utilizando como soporte informático el programa OP Controller v.1.2.1.108 and the OP Manager v.1.2.1.107 software (Olympus Optical CO., GmbH, Hamburg, Alemania).

Posteriormente las células madre sin diferenciación fueron mezcladas con el soporte o carrier que se describe en el siguiente apartado.

#### 4.2 Fosfato cálcico.

La lesión provocada artificialmente en el modelo animal fue rellenada con gránulos de CONDUIT, una cerámica osteoconductor en forma de TCP- $\beta$  y que a la vez sirvió de soporte para las MSC (figura 4).

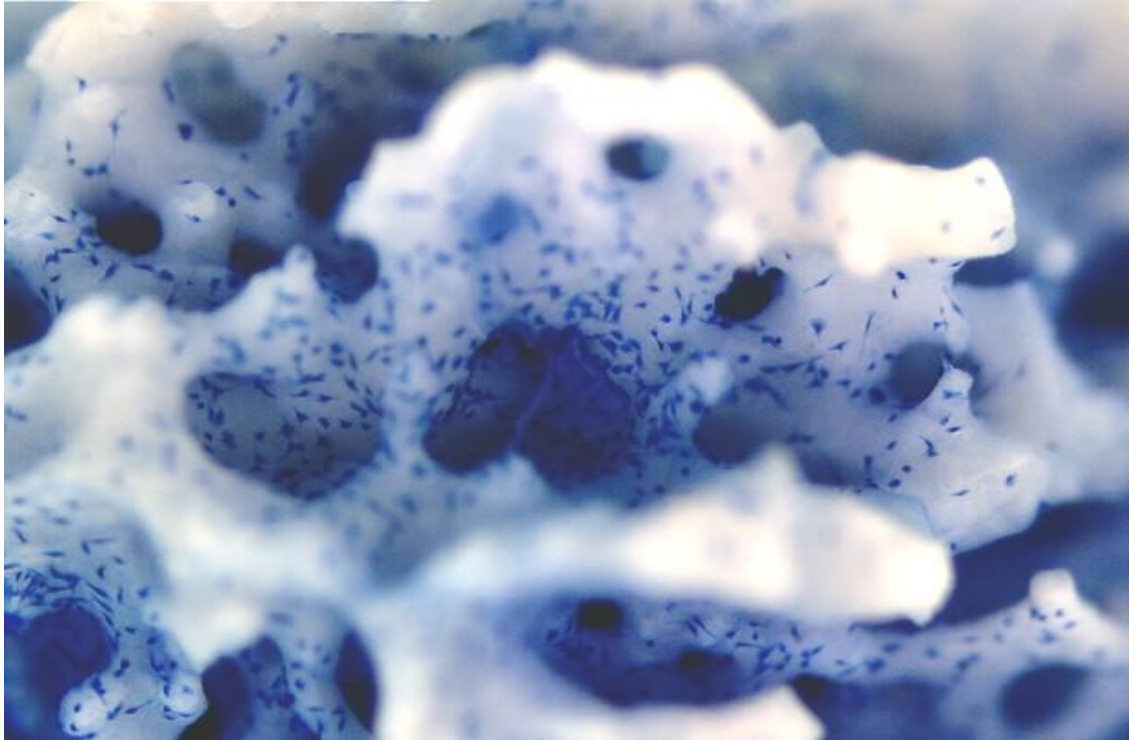


Figura 4: Células mesenquimales sobre el soporte o carrier.

Este sustituto óseo es de origen completamente sintético y posee una proporción de calcio y fósforo similar al hueso esponjoso natural. Presenta una estructura trabecular con un tamaño de poro de entre 1-600 micras, emulando la estructura del hueso sano (figuras 5 y 6). Una vez implantado en el modelo animal, se hidrata a través de la propia sangre del hueso trabecular del fémur.

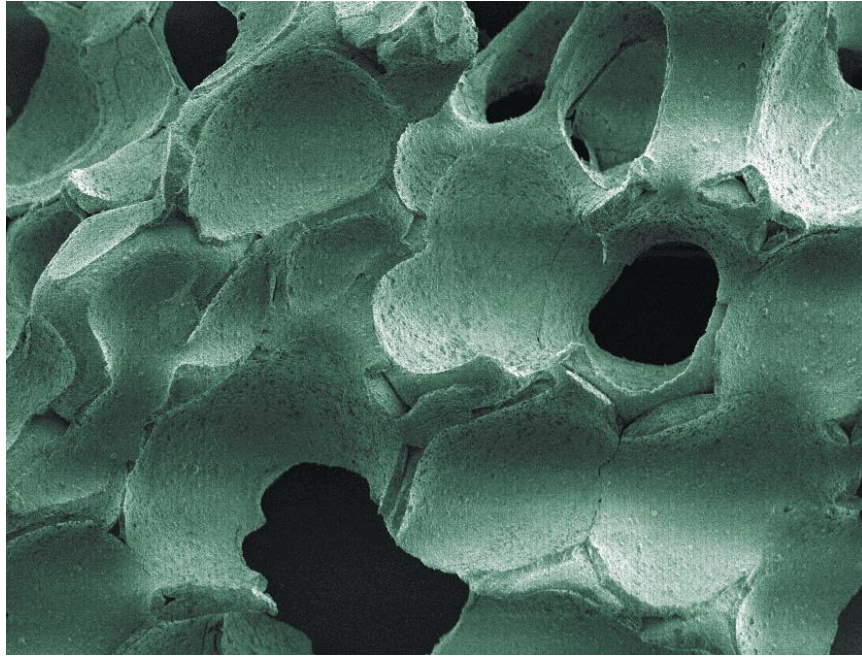


Figura 5: Visión microscópica de gránulos de Conduit (x50).

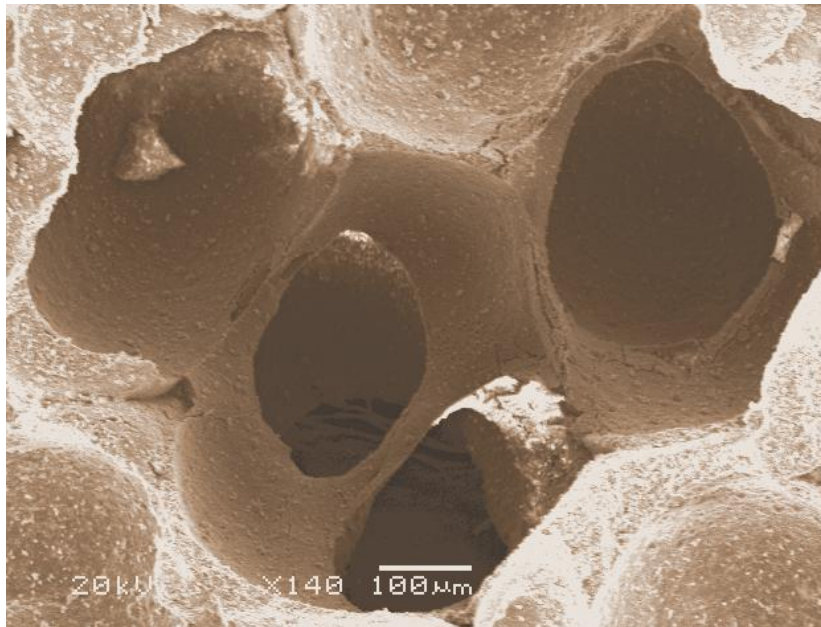


Figura 6: Visión microscópica con aumento x140.

Además de servir de lecho para las MSC, este sustituto permite el crecimiento óseo a través de su estructura integrándose en el hueso del huésped. Posteriormente sufre un proceso progresivo de reabsorción debido a que es reconocido por los osteoclastos al igual que el hueso natural y degradado de una manera similar.

#### **4.3 Modelo animal.**

El modelo animal elegido fue el conejo New Zealand. Se intervinieron 16 conejos machos adultos con un peso entre 2.5 Kg y 3.5 Kg, siguiendo la normativa vigente sobre experimentación con animales según la directiva europea (DE 86/609/CEE). Los conejos se mantuvieron en cuarentena en el animalario del Edificio Departamental de la Universidad de Salamanca previa a la cirugía.

Se inyectó en el músculo bíceps femoral una mezcla de Xilacina 5mg/Kg (Rompun® 2%, 25ml) y Ketamina 35mg/Kg (Ketolar® 50 mg/ml) según el peso de cada conejo, mediante una jeringa de 10ml ( Braun, Omnifix®) y una aguja intramuscular (BD Microlance® 0,8x40 mm, 21 G). Se completó el proceso anestésico con ventilación con oxígeno e isoflurano.

Una vez anestesiado cada conejo, se procedió el lavado con clorexidina al 4% y rasurado de la zona quirúrgica de la rodilla de cada apta. Se preparó un campo quirúrgico con todos los elementos necesarios para cumplir con las medidas de asepsia reglamentarias de todo procedimiento quirúrgico (Figura 7)



Figura 7: Campo quirúrgico.



La vía de abordaje consistió en una incisión en la cara anterior de la rodilla de las patas traseras de unos 3-4cm, realizada con un bisturí del número 24 (B Braun®). Se realizó una disección longitudinal por detrás del vasto lateral y a continuación una artrotomía de la articulación de la rodilla para exponer el cóndilo femoral lateral. Este procedimiento se realizó de forma bilateral en todos los conejos.

Una vez expuesto el cóndilo femoral se realizó una cavidad cilíndrica con motor eléctrico, hasta alcanzar un diámetro de 6mm y una profundidad de 8 a 10mm. Este es el denominado “defecto crítico”, el cual no es curado espontáneamente por el organismo (Figura 8).

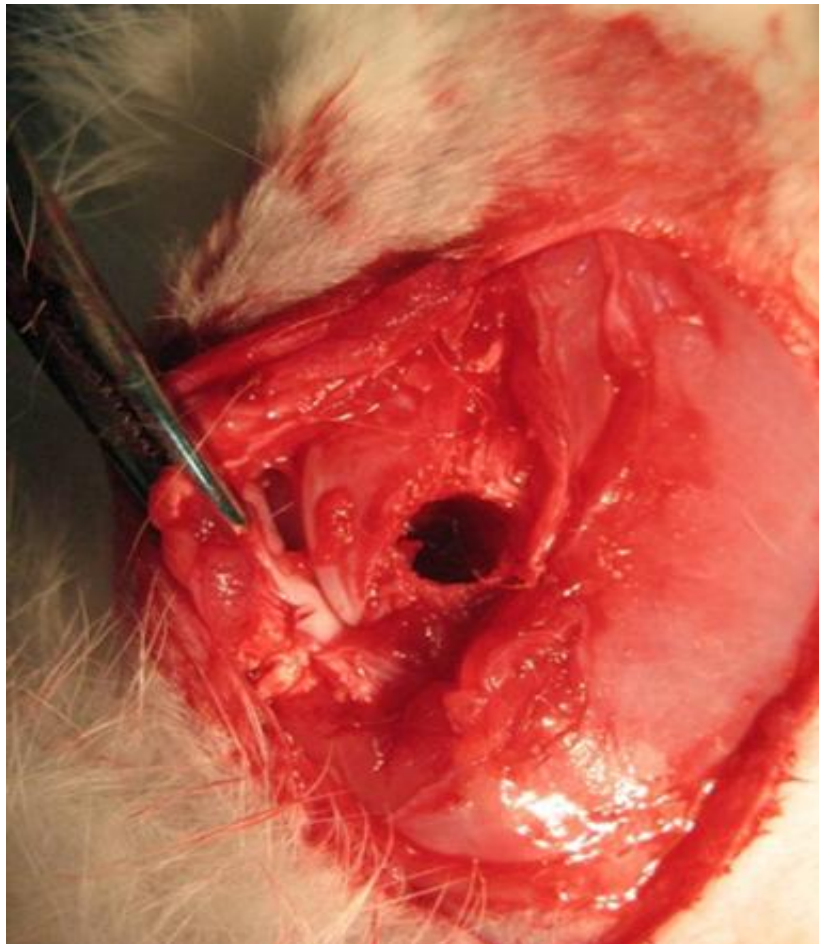


Figura 8: Defecto crítico

En el cóndilo femoral derecho se implantó el carrier (Conduit) embebido con las MSC en cantidad aproximada de  $1 \times 10^7$ . En el lado izquierdo se implantó solamente el carrier de la misma composición y cantidad que en lado contralateral (Figura 9).



Figura 9: Implante del carrier y MSC en el cóndilo



El cierre se practicó en dos planos, el primer plano cerrando la artrotomía con seda y aguja triangular (Ethicon ®, 0/75 cm), y el segundo plano, cerrando la piel y tejido celular subcutáneo con dicha sutura (Figura 10).



Figura 10: Cierre completo

Se aplicó una dosis profiláctica para infecciones de Gentamicina 25mg/Kg (Genta- Gobens® 2ml/80 mg). Posteriormente los conejos fueron devueltos a sus jaulas, monitorizándose en el postoperatorio inmediato, signos de dolor, infección o alteraciones en el comportamiento.

A los tres meses del tratamiento se procedió al sacrificio de los animales mediante inyección intravenosa de pentobarbital 120mg/kg (Penta- Hypnol®) . Las muestras para el análisis histológico y radiológico se obtuvieron mediante desarticulación quirúrgica de ambos extremos distales del fémur el tratado, derecho y el control izquierdo para su comparación.

#### **4.4 Análisis histológico.**

##### **4.4.1 Análisis macroscópico.**

El análisis macroscópico se realizó tras una correcta disección de los cóndilos femorales de cada conejo, tanto en la pata caso como en la control, siendo analizadas por un observador, no conocedor del lugar de implantación de las MSC.

##### **4.4.2 Análisis microscópico.**

###### **4.4.2.1 Fijación de la muestra.**

La fijación se realizó lo más rápidamente posible y consistió en la inmersión en formol 4% y ácido pícrico 0,2% en tampón fosfato 0,1M pH7,3. Tanto la fijación como los siguientes pasos de deshidratación e infiltración se realizaron a 4º C.

###### **4.4.2.2 Deshidratación.**

La deshidratación se realizó en series de alcohol etílico de graduación creciente.

La deshidratación se llevó a cabo a 4º C y previamente se consiguió un ligero vacío en los viales con el fin de evitar posibles riesgos. A su vez, se atemperaron los recipientes antes de cambiar las muestras de solución.

#### ***Procedimiento***

- Alcohol etílico 70%, 2 baños de 1-2 días.
- Alcohol etílico 95%, 3 baños de 2 días.
- Alcohol etílico absoluto, 3 baños de 1 día.
- Xileno, 2 baños de 1 día.

###### **4.4.2.3 Infiltración**

Para la infiltración se sumergieron las muestras en soluciones de Metil Metacrilato (monómero), dibutil-ftalato (plastificador) y concentraciones

crecientes de peróxido de benzoilo (iniciador) hasta una solución final idéntica a la solución de polimerización.

### ***Desestabilización del metil-metacrilato.***

El metil-metacrilato comercial (Aldrich química) se encuentra estabilizado con 10 ppm de hidroquinona-monometil-éter para evitar la polimerización espontánea durante el transporte.

Para la extracción de la hidroquinona se realizó el siguiente procedimiento: se lavó el monómero estabilizado con hidróxido sódico 5% (p/v) (22) en un embudo de decantación, se agitó fuertemente, y tras su reposo se eliminó la fracción oscura. Este procedimiento se repitió hasta que el efluente salió limpio. El siguiente paso consistió en eliminar los restos de hidróxido sódico, para ello se lavó en 100 ml de H<sub>2</sub>O(d), se agitó y se eliminó el efluente; repitiendo la operación 4-5 veces hasta que el efluente mostró un pH neutro. Posteriormente se desecó el monómero filtrándolo a través de cloruro cálcico.

### ***Preparación de las soluciones de infiltración.***

Se prepararon tres soluciones diferentes de infiltración.

#### Solución I

- 75 ml de metil-metacrilato.
- 25 ml de dibutil-ftalato.
- 0,5 ml de alfa-terpineno al 1% en Metil Metacrilato.

#### Solución II

- 75 ml de metil-metacrilato.
- 1 g de peróxido de benzoilo.
- 25 ml de dibutil-ftalato.
- 0,5 ml de alfa-terpineno al 1% en MMA.

### Solución III

- 75 ml de metil-metacrilato.
- 2,5 g de peróxido de benzoílo.
- 25 ml de dibutil-ftalato.
- 0,5 ml de alfa-terpineno al 1% en MMA.

Las soluciones I y II se almacenaron a 4° C durante una semana, pero la Solución III se preparó el mismo día de su utilización.

### **Procedimiento**

- Solución I, 3 días.
- Solución II, 4 días.
- Solución III, 6 días.

La infiltración debe llevarse a cabo a 4° C y es conveniente mantener una presión de 22 mm Hg en el interior del vial mediante la utilización de una bomba de vacío.

#### **4.4.2.4 Polimerización.**

La polimerización se realizó atendiendo al siguiente protocolo:

- Previamente se preparó una capa polimerizada en el fondo de un vial de boca ancha de 30 ml vertiendo 5 ml de Solución III recién preparada.
- Se tapó herméticamente para evitar que el O<sub>2</sub> inhiba la polimerización, y se mantuvo a temperatura ambiente durante una noche.
- A continuación se colocó el vial en un baño termostataado de agua a 38° C, produciéndose la polimerización en 1-3 días.
- Posteriormente se colocó la muestra previamente infiltrada sobre la capa prepolimerizada del vial, se orientó de manera adecuada y se rellenó el molde casi completamente con Solución III reciente.
- Se cerró y se mantuvo a temperatura ambiente durante una noche.

- Transcurrido este tiempo se colocó el vial en un baño termostatado de agua a 38° C. La polimerización suele tener lugar a los 2-3 días.

#### **4.4.2.5 Preparación de la muestra incluida.**

Los viales con la muestra incluida en la matriz de Metil Metacrilato polimerizada se mantuvieron a -20° C durante 1-2 horas para facilitar la separación del cristal. Los viales fríos se envolvieron en papel y se golpearon suavemente hasta romper el cristal. Los bloques para microtomía tenían un tamaño aproximado de 3x1cm, para lo que se utilizó una sierra con cuchilla de diamante (ACCUTOM-2) a una velocidad de desplazamiento de 0,8-1 mm/min y 2800 rpm intentando que la muestra quedase centrada en el bloque.

#### ***Corte y montaje.***

Se empleó un micrótopo motorizado y de deslizamiento vertical. La motorización es absolutamente indispensable, ya que es necesario que durante el proceso de corte se mantenga constante una velocidad mínima. La cuchilla empleada era de tipo-D y con filo recubierto de carburo de tungsteno (Leica 24933).

El grosor de corte mínimo obtenido con esta técnica es de 3-5  $\mu\text{m}$  para permitir enfoques precisos a microscopía óptica (100X, 200X). Durante el proceso de corte se humedeció continuamente el filo de la cuchilla y la superficie de corte del bloque con alcohol etílico 40% a partir del momento en el que comienza el corte. Se recogió la sección con unas pinzas y se colocó sobre un baño termostatado de H<sub>2</sub>O destilada a 60-70°C para expandir el corte y evitar posibles arrugas. Posteriormente se recogieron las secciones y se colocaron sobre porta-objetos gelatinizados. Se colocó una lámina de teflón sobre el corte y se deslizó un rodillo fotográfico sobre la muestra para eliminar las gotas de agua que pudieran quedar atrapadas. Se colocaron los porta-objetos separados por papel de filtro en una prensa para escurrirlos y se dejaron a 40-50°C durante una noche. Posteriormente, se retiraron las láminas de teflón y de papel de filtro y se mantuvieron los porta-objetos a temperatura ambiente.

#### 4.4.2.6 Tinción.

El protocolo de tinción comenzó con la desplastificación de las secciones para eliminar el metilmetacrilato mediante 3 baños de 25 minutos de Triclorometano (cloroformo y xileno en proporción 1/1).

Las secciones ya desplastificadas se rehidrataron pasándolas por una serie de etanol de graduación decreciente y se realizó la tinción.

#### ***Tinción de Azul de Toluidina.***

El azul de toluidina es una sustancia colorante derivada del aminotolulol de uso muy común en histología. Este colorante tiñe estructuras basófilas y se puede comportar como colorante ortocromático (tiñe de color azul) o metacromático (tiñe de color violeta rojizo), dependiendo del pH y la naturaleza química de la sustancia teñida. En suspensión presenta un color azul, y cuando se expone a estructuras ricas en enlaces amínicos (heparina, condroitín sulfatos, etc) las moléculas de esta sustancia se ordenan tomando un color rojizo, por efecto de su propiedad metacromática. En nuestro caso, el azul de toluidina tiñe metacromáticamente las zonas de cartílago. Respecto a las trabéculas óseas, ofrece una tinción ortocromática de intensidad media en aquellas cuya matriz se encuentra mas calcificada mientras que la tinción es mas débil en zonas de matriz ósea de reciente generación, mas inmadura, y por tanto menos mineralizada. En todos los casos los osteocitos y osteoblastos adquieren una coloración ortocromática intensa.

Para realizar esta tinción seguimos el siguiente protocolo:

1. Las secciones de 7  $\mu\text{m}$  obtenidas en el micrótopo y colocadas sobre el portaobjetos se cubrieron con una solución de toluidina/bórax, manteniéndose sobre una placa calefactora a 60° unos minutos (hasta que la solución colorante comenzó a emitir vapores).

#### Solución de azul de toluidina/Bórax

- Azul de Toluidina 4g
  - Bórax (tetraborato sódico) 5g
  - Agua destilada 500ml
2. Lavado las secciones en agua corriente
  3. Secado en estufa a 37°C.

4. Paso rápido por etanol absoluto (1x2min), aclarado en xilol (2x5min) y montaje en Entellán (Merck) y cubreobjetos.

#### **4.4.2.7 Resultados.**

En las laminillas óseas preexistentes la matriz ósea aparece teñida ortocromáticamente con intensidad media, mientras que son visibles los cuerpos celulares de los osteocitos/osteoblastos, teñidos de azul intenso, inmersos entre ellas. La matriz de las zonas de osteogénesis reciente aparece con el mismo tipo de coloración pero de menor intensidad.

#### **4.4.2.8 Obtención de las imágenes microscópicas.**

Las secciones fueron examinadas en un fotomicroscopio (Zeiss AxioScope A.1) conectado a una cámara digital (Zeiss HRc), la cual, a su vez, estaba acoplada a un soporte informático con el software adecuado (Zeiss AxioVision 4.8) a través de la cual se capturaron las imágenes digitales. En todos los casos, estas imágenes digitales fueron procesadas con el software Adobe Photoshop CS2 (v. 9.0) con el que se realizaron únicamente ajustes de resolución y ligeras modificaciones de brillo y contraste para unificar las características de las imágenes.

#### **4.4.2.9 Inmunofluorescencia.**

##### **Principio.**

Con el objeto de identificar la presencia y participación de las MSC humanas en el tejido regenerado, se procedió a la detección de las mismas mediante inmunofluorescencia. El fundamento consistía en identificar en las secciones de tejido una proteína glicosilada de 60 KDa que aparece específicamente en la membrana de las mitocondrias humanas.

La detección se realizó mediante el uso de un anticuerpo monoclonal específico frente a esta proteína, generado en ratón (MAB1273 Millipore).

##### **Método.**

El método de inmunofluorescencia se desarrolló del siguiente modo:

- 1) Los portaobjetos que contenían las secciones, previamente desplastificadas e hidratadas, se sumergieron durante 20 min, en agitación constante, en una solución de borohidruro sódico

(NaBH<sub>4</sub>) al 1% en tampón fosfato 0.1M y con pH 7.4. El borohidruro sódico es un agente reductor que actúa sobre los grupos aldehído presentes en el tejido y los reduce a grupos hidroxilo, eliminando así la autofluorescencia propia de los grupos aldehído.

- 2) Se realizaron cinco lavados de 10 min en tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 a temperatura ambiente para eliminar completamente los restos de borohidruro sódico.
- 3) A continuación se preincubaron las secciones durante 60 min a temperatura ambiente en una solución de preincubación constituida por Tritón X-100 al 0.2% y suero normal de cabra al 5%. El Tritón X-100 (p-isooctilfenoxi-poli-etoxietanol) disuelve moderadamente las membranas lipídicas favoreciendo la penetración de los anticuerpos así como de los demás componentes involucrados en la reacción inmunofluorescente. El suero normal hace que disminuyan las uniones inespecíficas de los anticuerpos.
- 4) Seguidamente se realizó la incubación con el anticuerpo primario. La solución de incubación está constituida por los mismos componentes que el medio de preincubación, en el que fue diluído el anticuerpo primario (antiproteína mitocondrial humana) 1:100. La solución se añadió cuidadosamente sobre los portaobjetos que contenían las secciones y éstos se introdujeron en una cámara húmeda durante 48 horas a 4°C.
- 5) A continuación se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 y temperatura ambiente, destinados a eliminar los restos de anticuerpo primario no unido al tejido.
- 6) Se incubó durante una hora y media a temperatura ambiente, en un medio de incubación que contenía un anticuerpo secundario diluído 1/500 en tampón fosfato 0.1M, pH 7.4. El anticuerpo secundario era una IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugada con el fluorocromo cianina 3 (Cy3) (Jackson Inmunoresearch) que reconoce específicamente el anticuerpo primario utilizado.



- 7) Se realizaron tres lavados de 10-15 min en tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 a temperatura ambiente y en oscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia.
- 8) Finalmente los portaobjetos que contenían las secciones se cubrieron con un medio adecuado para preservar la fluorescencia (Gel Mount, G0918, SIGMA). Se colocaron los cubreobjetos y se sellaron los bordes para maximizar la conservación de las muestras. Después se almacenaron en oscuridad y a 4°C.

### **Resultados.**

Las células stem humanas se identificaron por mostrar en el interior citoplasmático, fluorescencia de color rojo que se corresponde con la presencia de la proteína mitocondrial humana.

## **RESULTADOS**

## **5. Resultados.**

### **5.1 Análisis macroscópico.**

No se observaron datos clínicos, a nivel de la herida o la situación general de los animales que indicaran un posible rechazo o respuesta del huésped frente al injerto con MSC.

Se observaron 2 casos de infección en patas en las que se implantó el TCP aislado.

### **5.2 Análisis anatomopatológico.**

#### **5.2.1 Características generales de la tinción con azul de toluidina en animal control.**

La tinción con azul de toluidina pone de manifiesto las estructuras que conforman el cóndilo femoral, obteniendo diferentes grados de tinción orto y metacromática de los tejidos, en función de las características químicas de la matriz.

La totalidad del cartílago articular (hialino) apareció marcadamente metacromático, adquiriendo una coloración violeta-rojizo. Se observó la capa tangencial o superficial de condrocitos con aspecto fibroblástico. Bajo ella, la capa transicional, se encontraba formada por grupos de grandes condrocitos esféricos. La mayor parte del cartílago articular se veía representada por la capa profunda o radial en la que se hallaban los condrocitos sin un orden definido.

La siguiente capa se componía de un grupo de condrocitos hipertróficos y matriz calcificada, que adquirió un tono tintorial más intenso. Esta capa asentaba directamente sobre una capa transicional de tejido óseo que separaba el cartílago articular del hueso subcondral y que se distinguía por su carácter basófilo ortocromático en tono violeta.

La siguiente capa ya era el hueso trabecular como tal. En ella se distinguían las trabéculas óseas con moderada-baja apetencia por el colorante y entre ellas destacaban los cuerpos celulares, intensamente basófilos, de los osteocitos.

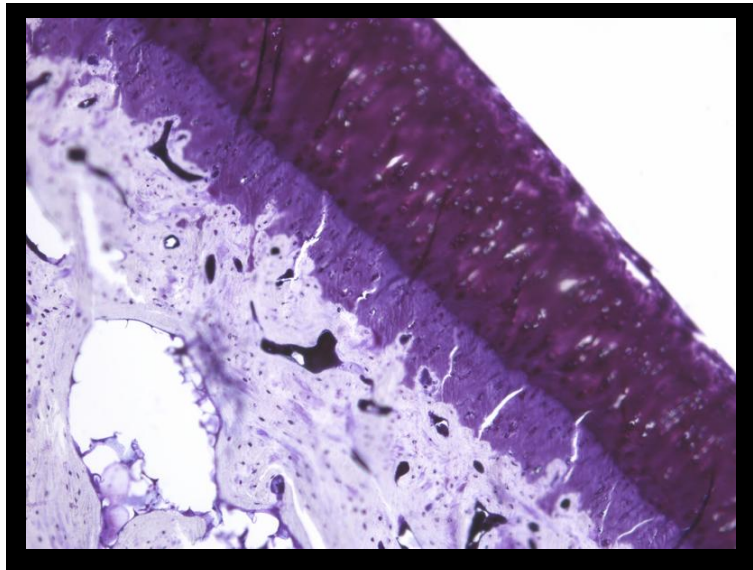


Figura 11: Características generales de la tinción con azul de toluidina.

### 5.2.2 Animales experimentales.

En todos los animales experimentales, tanto en los tratados con TCP- $\beta$  solo como en los tratados con TCP- $\beta$ +MSC<sub>s</sub>, pudo apreciarse, tras el tiempo de supervivencia, una neoformación de tejido óseo. No obstante tras realizarse un análisis “doble ciego” se diferenciaron claramente dos niveles de regeneración ósea cualitativamente distintos.

### 5.2.3 Grupo tratado con TCP- $\beta$ .

En este grupo de animales, tras el periodo de supervivencia, se continuaba evidenciando claramente el lugar de la lesión en el 100% de los casos. En esta zona lesionada se evidenciaban depósitos de TCP- $\beta$  en tonos pardos (Fig. 12). Si bien, el relleno de TCP- $\beta$  aplicado durante la cirugía, se perdía en gran medida por el denominado “efecto lavado” al realizar las secciones histológicas. Esto se debe a su escasa integración con el tejido circundante, dejando así los huecos que se muestran en la imagen, entre el tejido óseo (Fig. 13). Este fenómeno implica que aunque el TCP- $\beta$  es bien tolerado por parte del huésped, por sí solo, no favorece una reparación ósea de forma aislada.

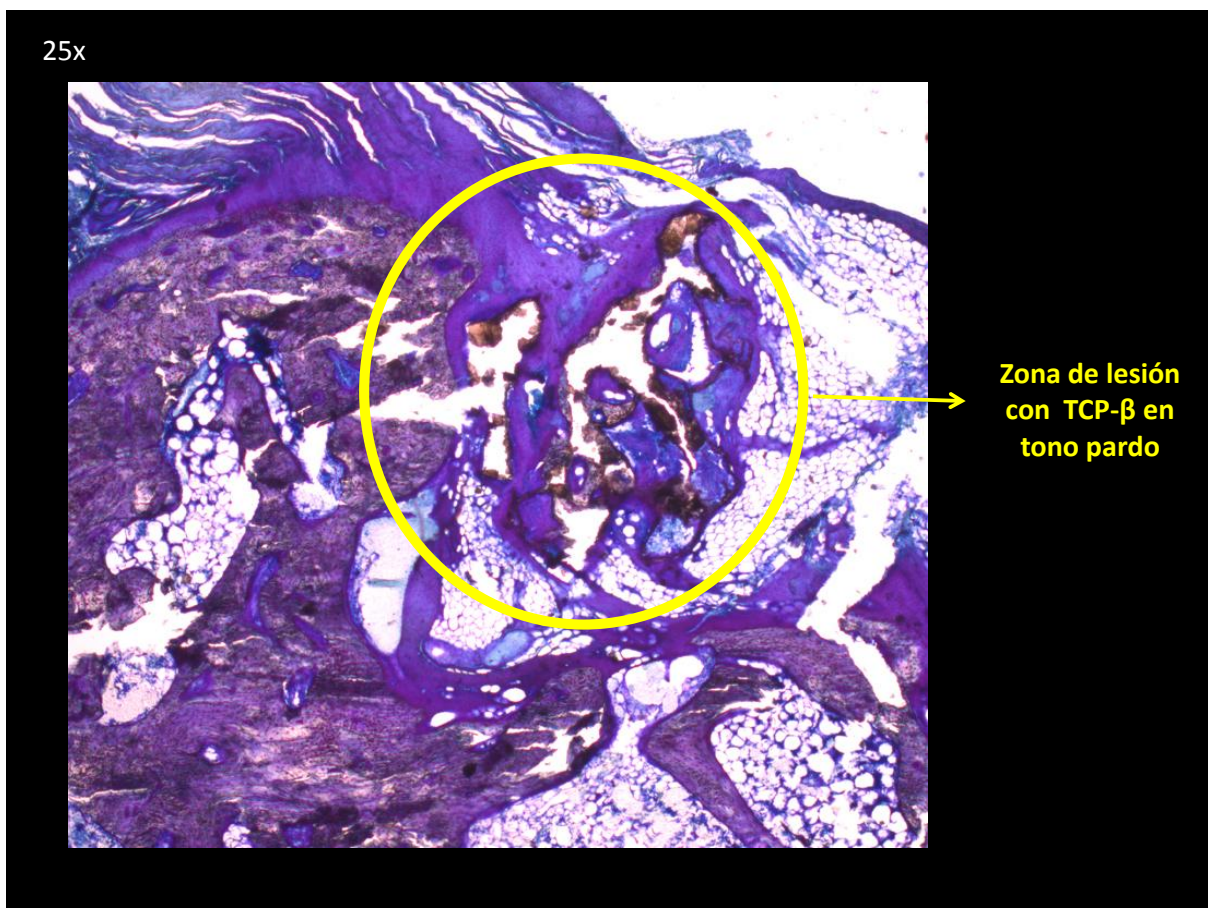


Figura 12: Zona lesionada con depósitos de TCP.

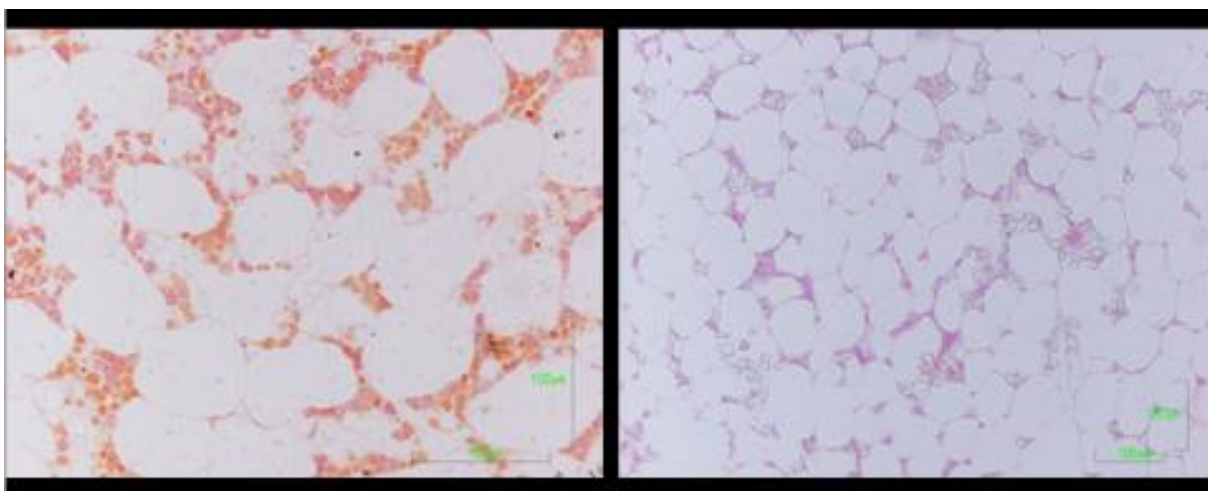


Figura 13: Fenómeno de lavado

En la siguiente imagen se aprecia con mayor claridad la formación de trabéculas óseas pero sin llegar a rellenar la zona lesionada. Las nuevas zonas de osificación se desarrollaron en torno al TCP- $\beta$  pero no existía generación ósea suficiente para restaurar la lesión y sólo se mantenían restos del mismo en contacto con las zonas de osificación. El resto del TCP- $\beta$  no integrado se había perdido al realizar la sección histológica por el efecto lavado.



Figura 14: Formación ósea sin integración del TCP.



Junto a las trabéculas óseas cuya matriz se encontraba calcificada (tinción más intensa), se podían apreciar zonas de nueva generación ósea, siempre en relación con partículas de TCP- $\beta$ , con coloración menos intensa.

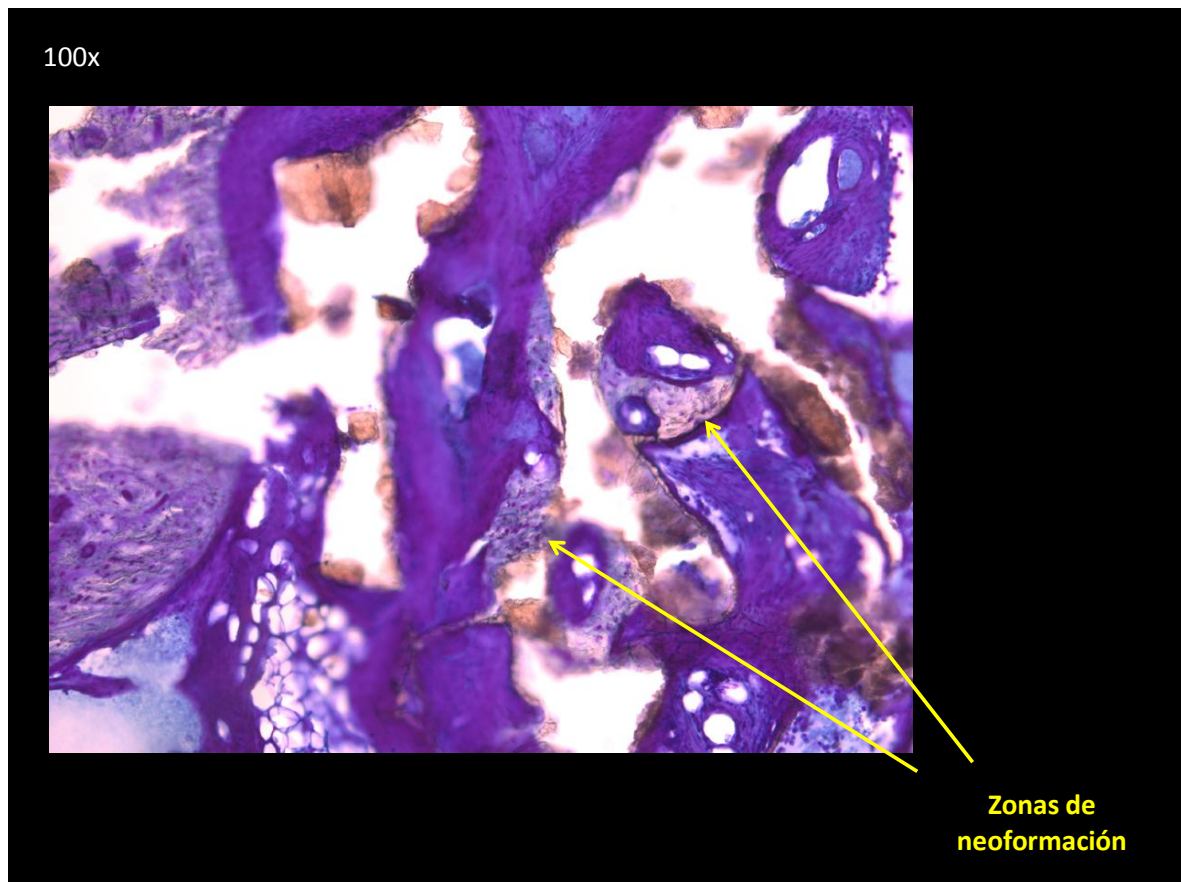


Figura 15: Zonas de neoformación ósea.

En las áreas de neoformación ósea se observaban claramente cuerpos celulares inmersos en la matriz, presentando una morfología acorde con la de los osteoblastos.

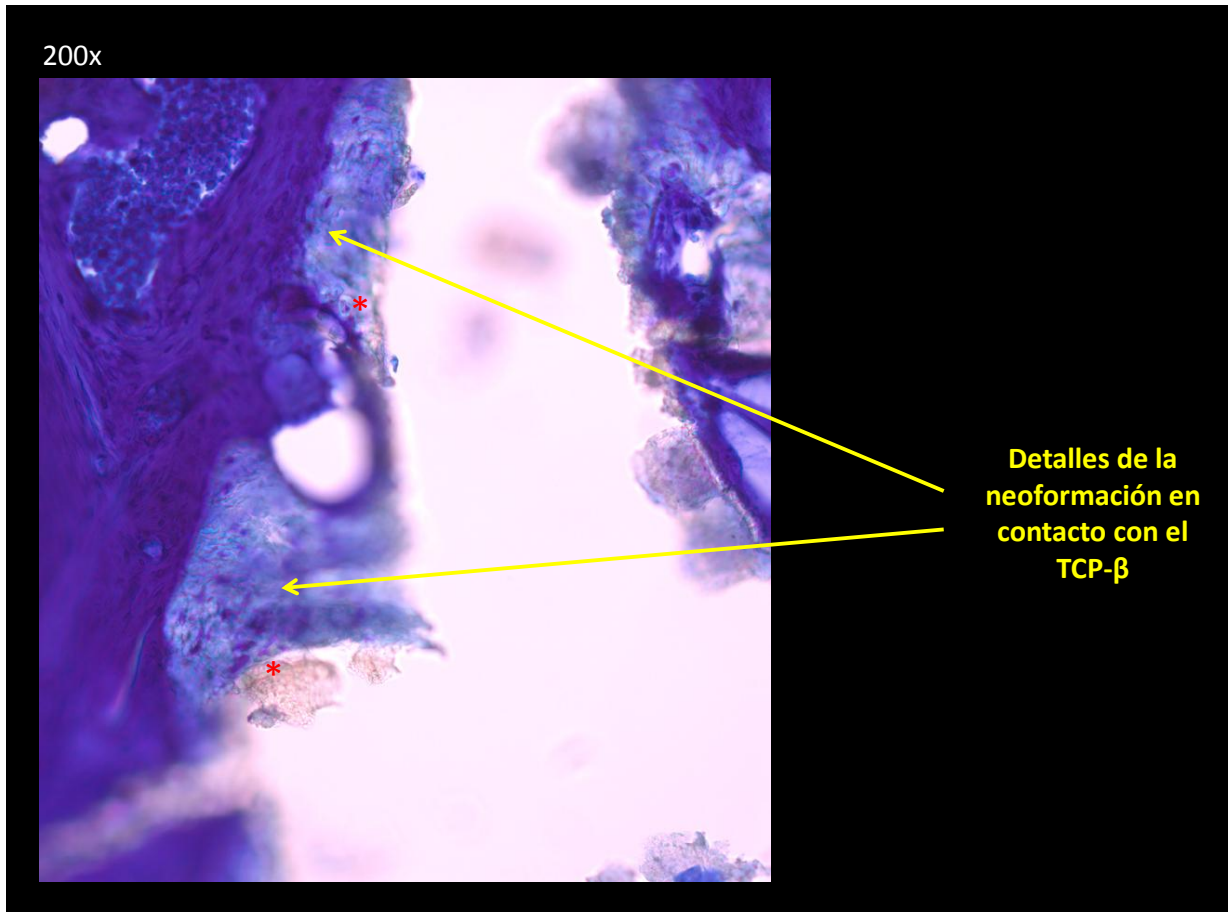


Figura 16: Cuerpos celulares en la zona de neoformación.



La siguiente imagen nos muestra en detalle una zona de neformación ósea, en cuyos bordes se distinguen los cristales del TCP- $\beta$ . También se diferencia la orientación de las laminillas óseas y los cuerpos de los osteocitos/osteoblastos. El resto del TCP- $\beta$  a la que no ha llegado el frente de osificación se ha perdido.

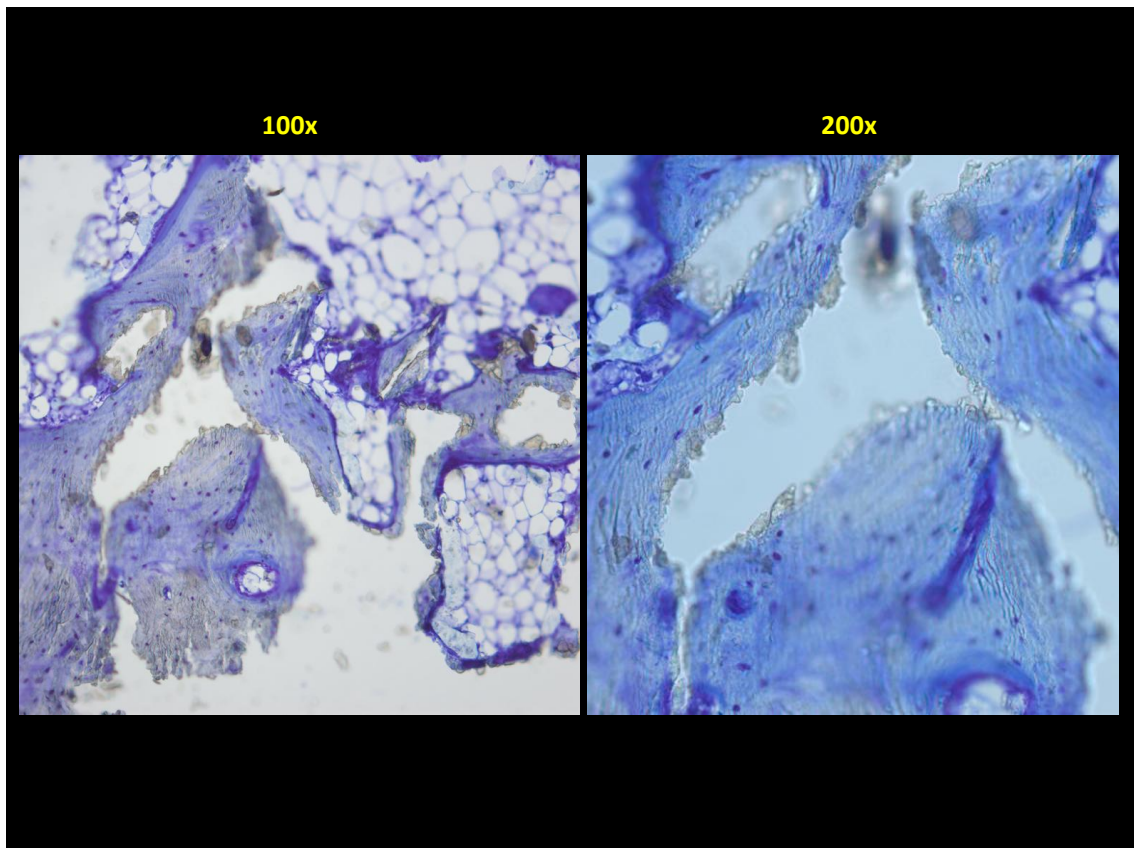


Figura 17: Laminillas óseas y cuerpos celulares.

#### 5.2.4 Animales tratados con TCP- $\beta$ y células madre humanas.

En este caso, apenas se producía el fenómeno del efecto lavado, y no se observaron datos microscópicos de respuesta inmune o fenómenos inflamatorios en contra de las MSC.

En los especímenes tratados con TCP+MSC el grado de recuperación de la lesión, aunque no es total, era notablemente superior al del otro grupo experimental. Podía apreciarse una mayor cantidad de tejido óseo de nueva formación (asteriscos amarillos), zonas en las que la matriz aparecía mas débilmente teñida debido a un menor grado de calcificación.

Además se observaban cristales de TCP- $\beta$  completamente integrados en esa nueva matriz ósea (asteriscos rojos).

También se descubrieron zonas de mayor grado de osificación dispersas entre las zonas de nueva generación, claramente diferenciables por presentar una tinción mas intensa.

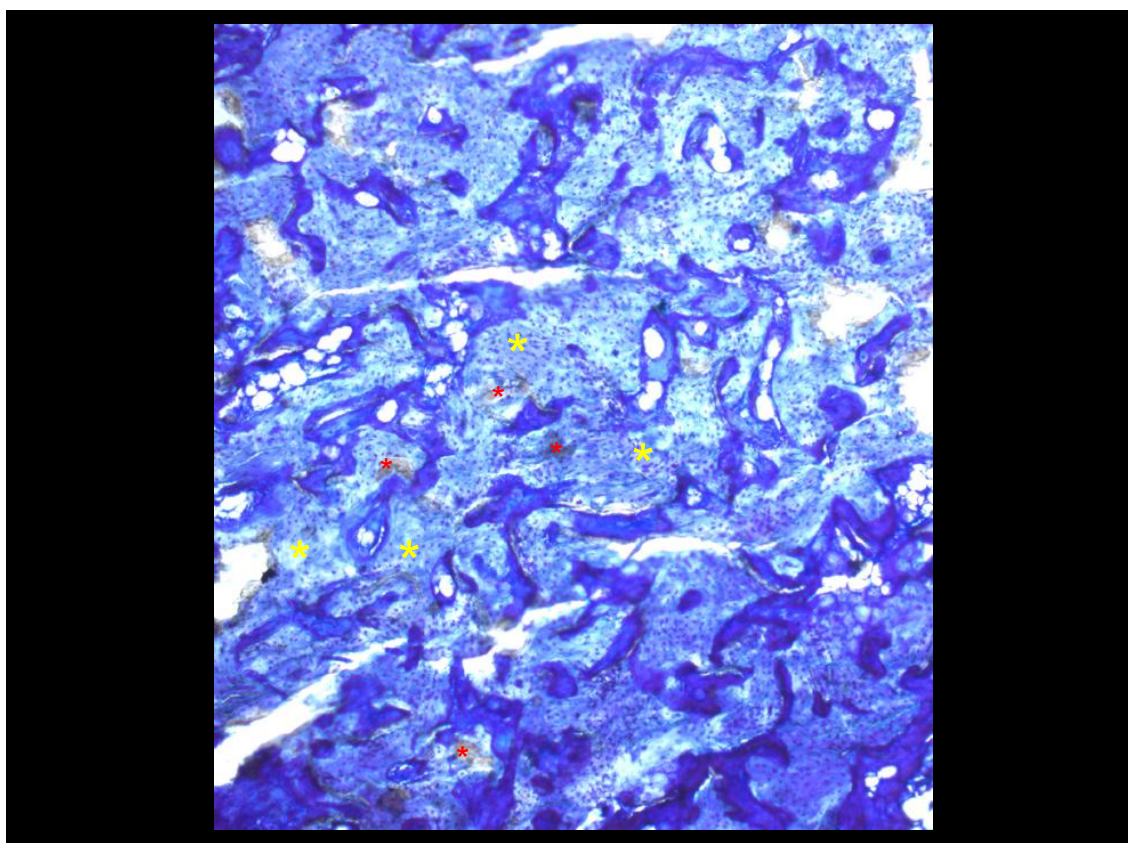


Figura 18: Neoformación en el grupo de las células madre

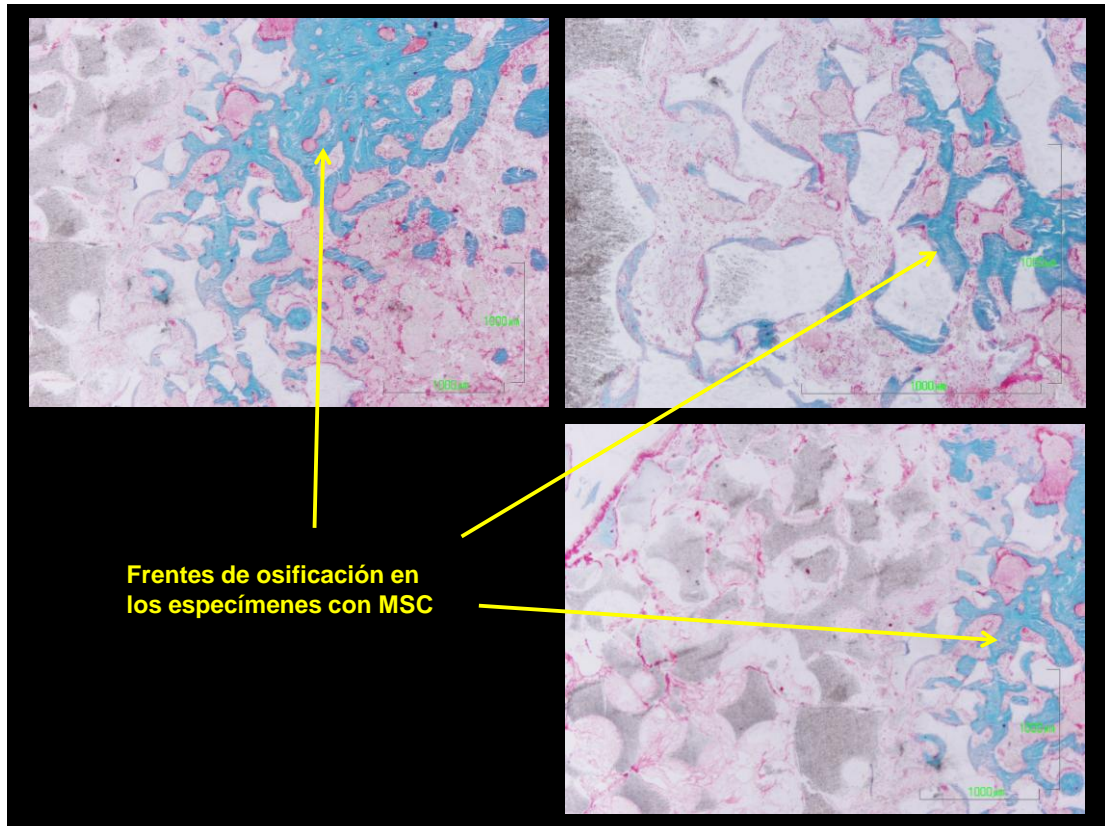


Figura 19: Frentes de osificación.



Las siguientes imágenes ofrecen detalles de neoformación ósea con cristales de TCP- $\beta$  perfectamente integrados en la matriz, aunque en algunas regiones puede observarse que la regeneración ósea no se ha producido al completo, quedando aún algunas zonas sin regenerar.

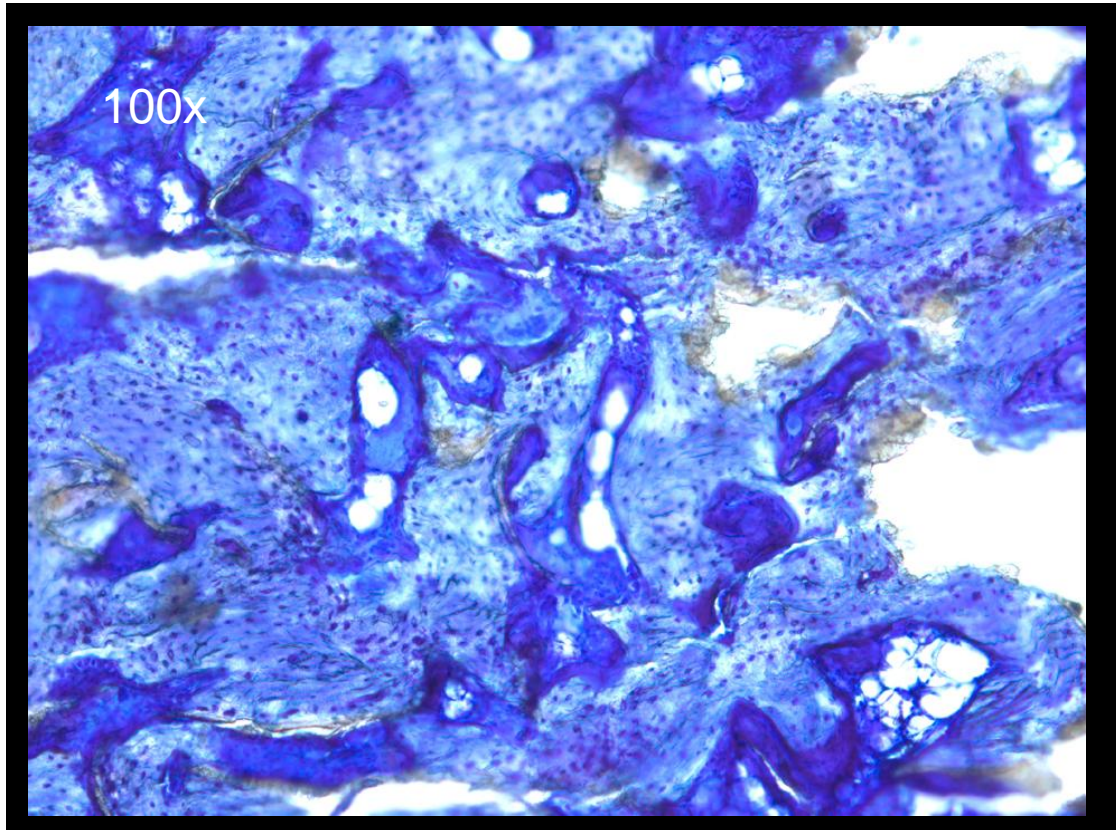


Figura 20: Regeneración con pequeñas zonas de vacío.

En las áreas de nueva generación ósea podían apreciarse células con la típica morfología de osteocito, justo en las regiones mas lejanas al frente de osificación. En cambio, en regiones próximas al frente, se veían células con morfología diversa, inmersas en la matriz ósea, que no se corresponden exactamente con una morfología osteocítica.

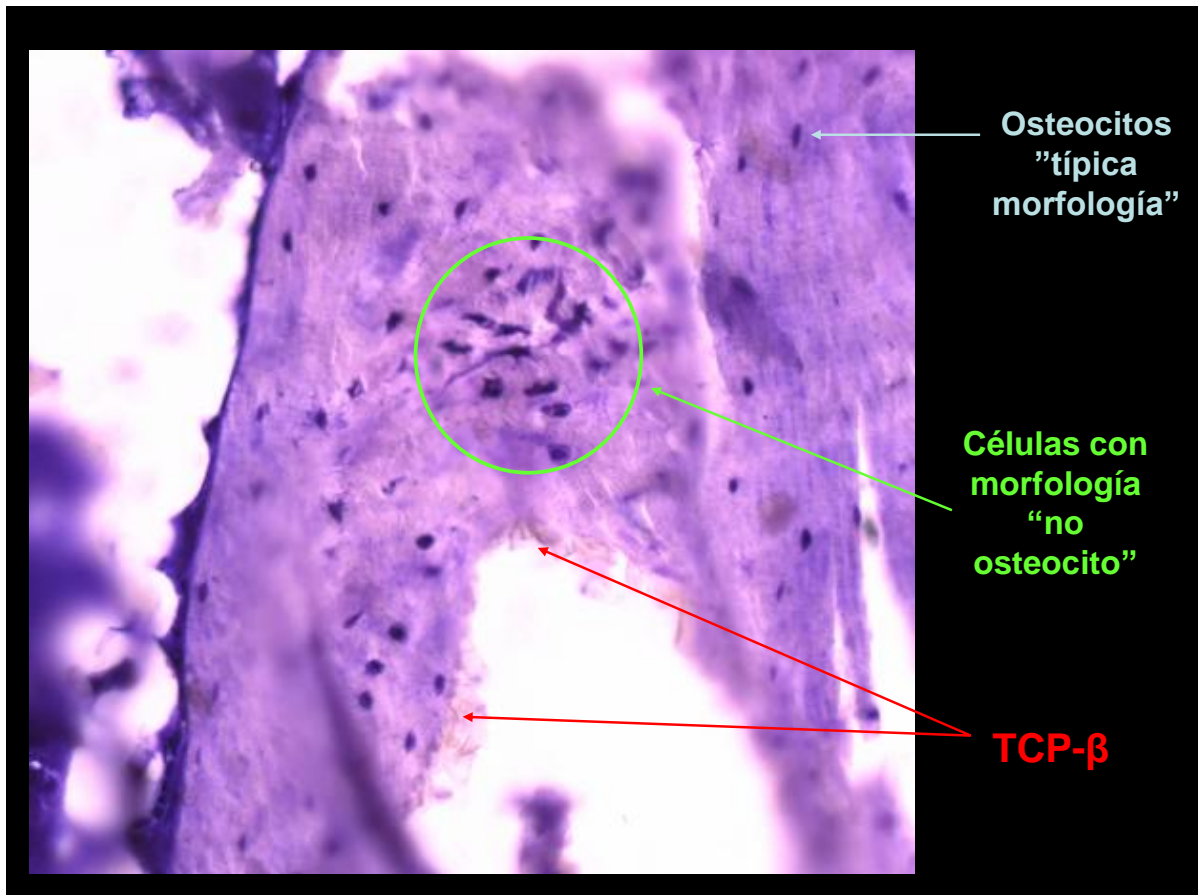


Figura 21: Osteocitos en la zona de regeneración.

Junto a las células que no presentaban morfología de osteocito, y que se hallaban cercanas al frente de osificación, se observaron acúmulos celulares intensamente teñidos y con cuerpos celulares mas o menos esféricos. Estos acúmulos se encontraban rodeados de cristales de TCP- $\beta$  y podrían corresponderse con colonias de células mesenquimales humanas añadidas en proceso de diferenciación hacia osteocito.

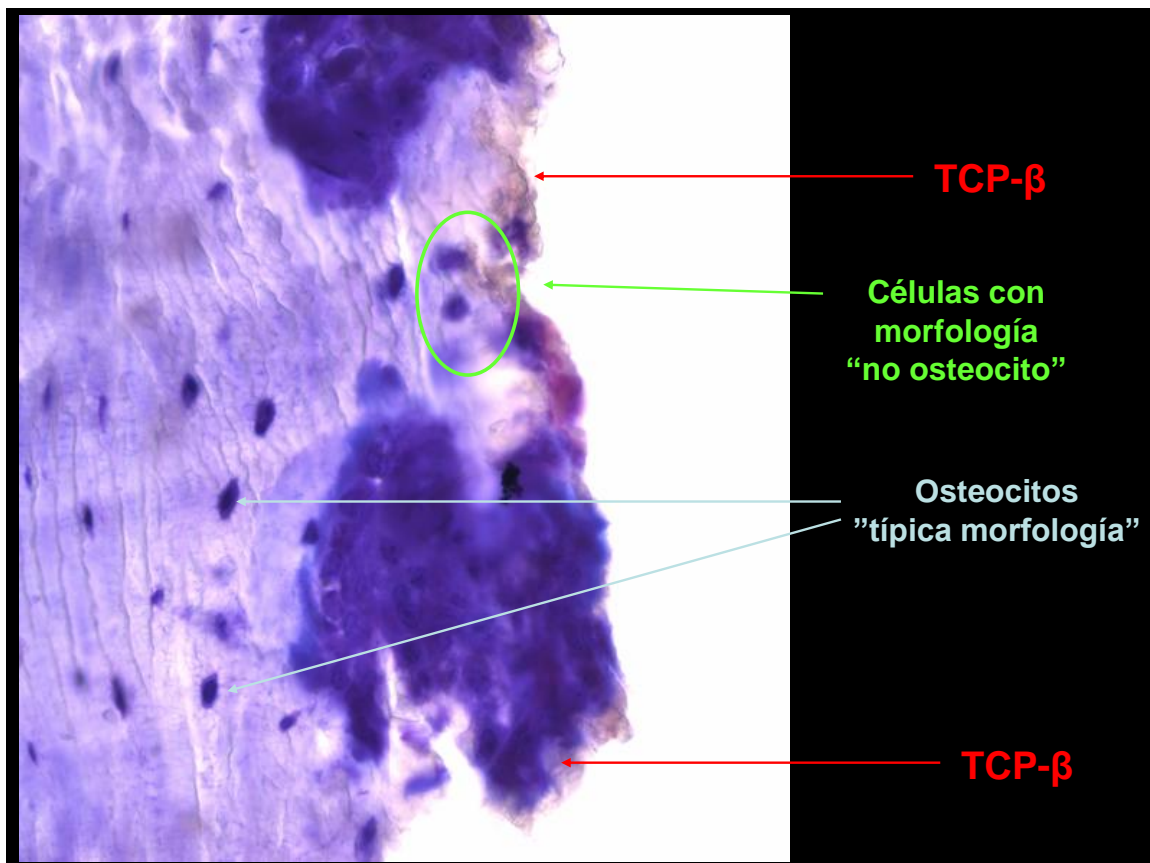


Figura 22: Acúmulos de células no osteocitarias.

En la siguiente imagen vemos en detalle la situación anterior, con los osteocitos de contorno ovalado y con expansiones citoplasmáticas extendiéndose por los conductos calcóforos entre las laminillas óseas.

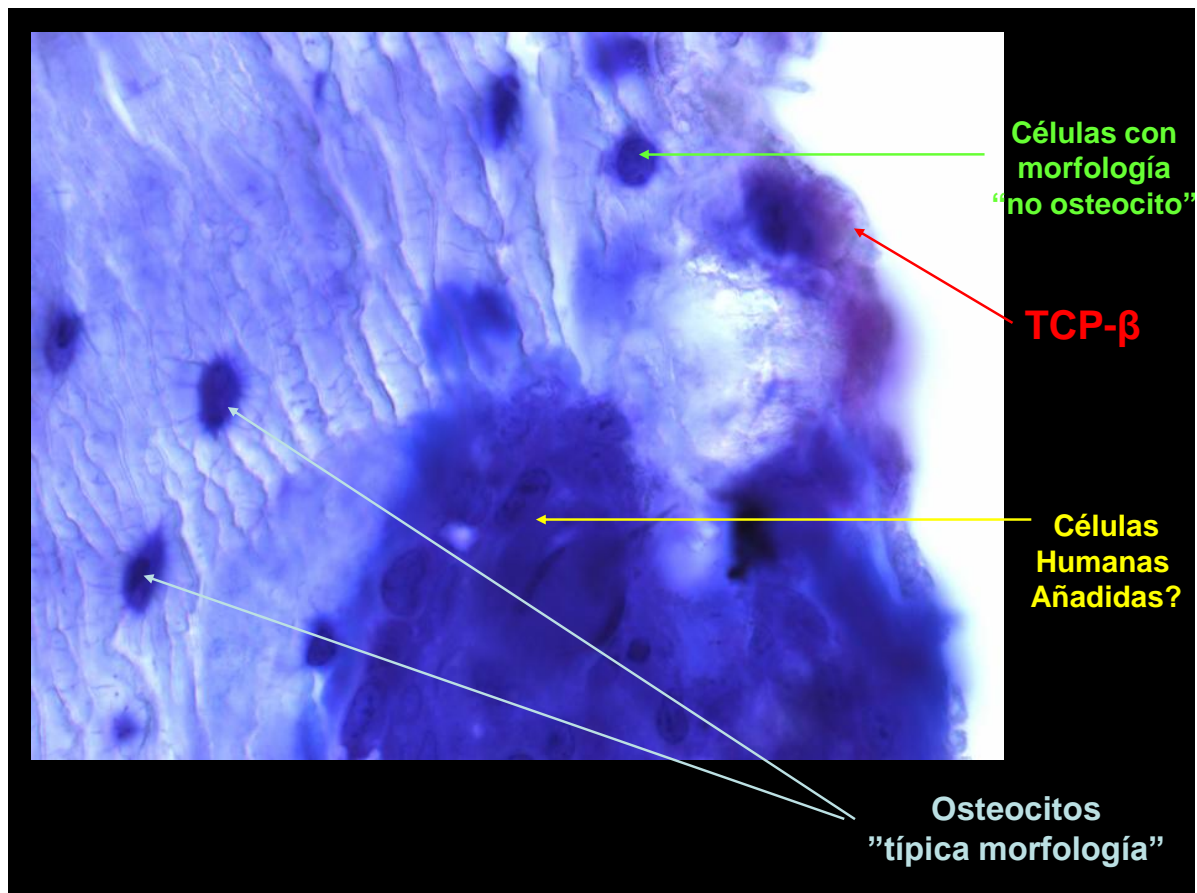


Figura 23: Osteocitos y células no osteocitarias.



Dadas las imágenes que se obtuvieron, con acúmulos celulares no típicos para el hueso, quisimos comprobar si podría tratarse de las propias MSC humanas añadidas al injerto. Esto significaría que dichas células, gracias a sus propiedades de inmunoprivilegio, habrían podido contribuir a la neoformación ósea y además, pervivir más allá de las 12 semanas en un animal inmunocompetente. El estudio inmunohistoquímico de las piezas, con anticuerpos antimitocondriales humanos marcados proporcionó las siguientes imágenes.

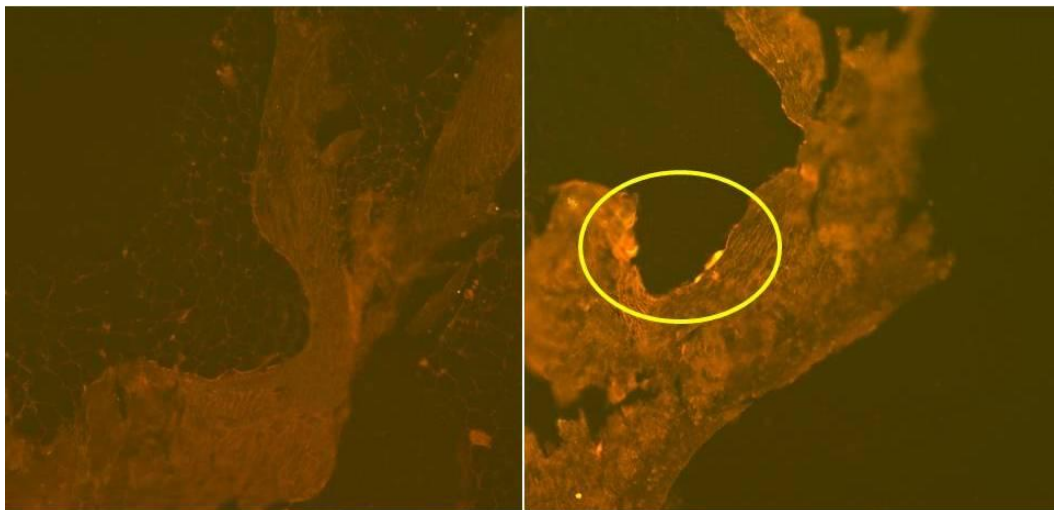


Figura 24: Comparativa entre espécimen sin MSC añadidas (izquierda) y espécimen con MSC añadidas al carrier (derecha)

En la figura 24 se puede observar una comparativa entre una pieza a la que no se añadió MSC humanas y una pieza con las células incorporadas. En la imagen de la derecha se identifican MSC humanas que han pervivido en el modelo animal durante los 3 meses.

En las siguientes imágenes podemos ver con más detalle acúmulos de MSC en diferentes patas de los conejos.



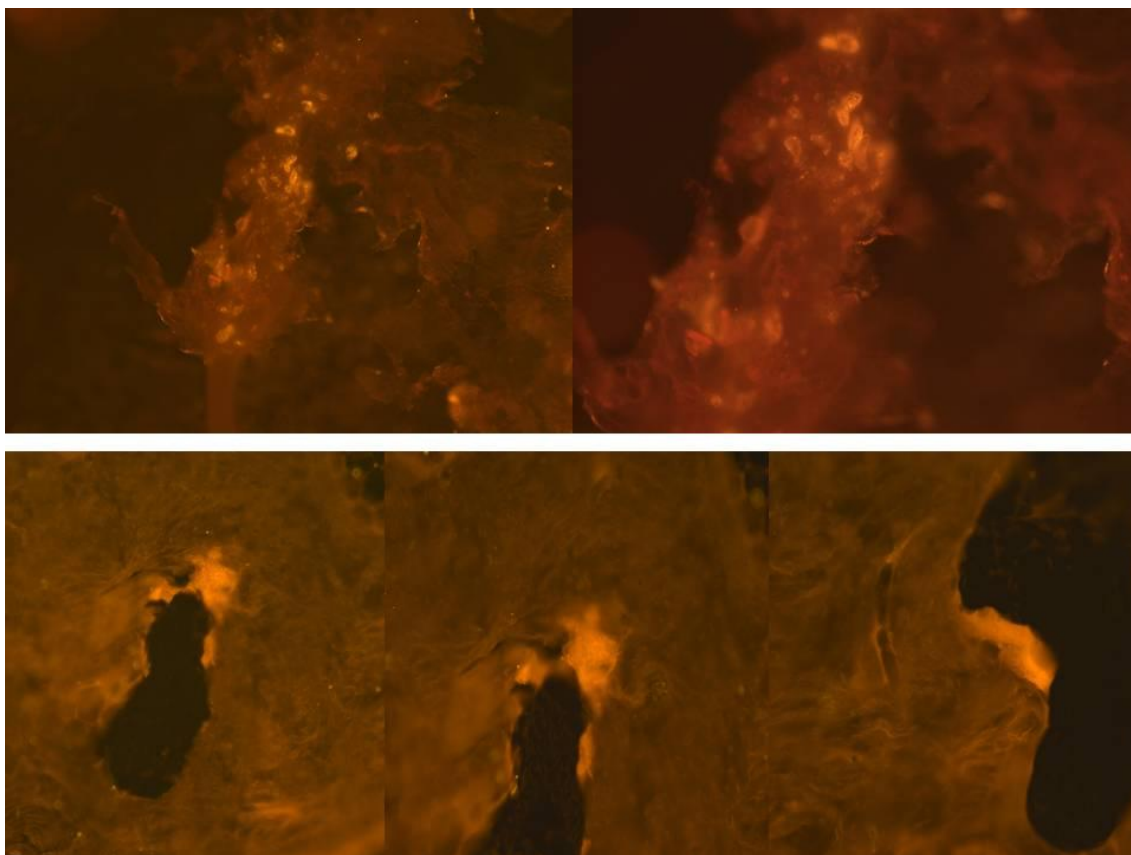


Figura 25: Acúmulos de MSC humanas que pervivieron 12 semanas

## **DISCUSIÓN**

## **6. Discusión.**

### **6.1 Modelo animal.**

En el presente estudio optamos por un modelo animal pequeño (conejo New Zealand) por varias razones que desarrollaremos a continuación. Estos animales, son utilizados en el 35% de los ensayos de investigación médica en cuanto al sistema musculoesquelético se refiere<sup>167</sup>. Su pequeño tamaño, implica una facilidad de manejo y almacenaje que no proporcionan animales de gran tamaño. Además el conejo New Zealand es un animal relativamente fácil de obtener para estudios científicos, hecho que propicia una fácil reproductibilidad de estos estudios.

Una propiedad interesante de los conejos para experimentación animal es que poseen un metabolismo mas rápido que otros animales. Esto facilita que el periodo postoperatorio hasta la obtención de resultados sea mas corto ayudando además a una contención de costes. Además, el conejo es considerado, en ocasiones, y de forma errónea como un animal frágil, cuando en realidad posee una gran capacidad de reparación de los tejidos en condiciones patológicas. De hecho posee una resistencia similar a la del cerdo, lo que le convierte en una opción idónea para estudios científicos en este campo<sup>168</sup>.

### **6.2 Regeneración ósea y TCP- $\beta$ .**

En la práctica clínica, el cirujano ortopédico, se enfrenta ocasionalmente a grandes defectos óseos propiciados por múltiples etiologías, como traumatismos, infecciones, tumores, defectos congénitos, etc. Estos defectos hacen que se trate de pacientes de manejo complicado.

Como es bien sabido, el patrón oro para tratar defectos óseos es el injerto autólogo. Debido a una serie de limitaciones, que hemos descrito en la introducción de este trabajo, se han ido desarrollando otras opciones como el injerto alogénico o los compuestos sintéticos. Estos últimos intentan imitar la estructura ósea para permitir un crecimiento del hueso huésped a través de sí mismos.

Los biomateriales empleados en ingeniería tisular constituyen un campo de investigación muy prolífico. Las características deseables para poder utilizar un biomaterial o sustituto sintético en un estudio son<sup>169</sup>:

- Biocompatibilidad
- Osteoconductividad
- Estructura porosa interconectada
- Resistencia mecánica aceptable
- Biodegradabilidad
- Permitir invasión vascular

Las cerámicas de fosfato cálcico son sustitutos sintéticos que se han venido utilizando en el tratamiento de defectos óseos desde hace décadas. Existen diferentes tipos de éstas cerámicas aunque la HA y el TCP- $\beta$  son las más comúnmente utilizadas. El TCP existe en dos formas,  $\alpha$  y  $\beta$ , dependiendo de la temperatura y la humedad con la que se fabrique. Ambas formas son solubles y susceptibles de resorción celular, pero el TCP- $\beta$  es más estable y menos soluble. En contrapartida, la HA no es reabsorbible, a no ser de que se trate de moléculas muy pequeñas. Dado que estos compuestos cerámicos no tienen una gran capacidad de soportar cargas mecánicas, el éxito en el tratamiento de defectos óseos con estos sustitutos, depende en gran medida de su capacidad para alcanzar una óptima tasa de degradación y reabsorción. Estos fenómenos deben de ir acompañados con una neoformación ósea<sup>170</sup>.

El TCP- $\beta$  es particularmente apto para estudios de regeneración ósea debido a que posee todas las características que se mencionaron anteriormente y además, su estructura 3D le confiere una gran superficie de contacto. Esto último es ideal para la siembra de células osteoformadoras y para el fenómeno de resorción ósea<sup>171, 172</sup>.

En nuestro trabajo, decidimos utilizar el TCP- $\beta$  por los motivos que se han expuesto anteriormente y además por presentar características idóneas para el diseño concreto de nuestro estudio. Estas son, unos niveles de reabsorción y neoformación ósea adecuados para los 3 meses de seguimiento, momento en el cual fueron sacrificados los conejos. En ensayos realizados con

una mayor duración (26 semanas), se ha comprobado que el TCP- $\beta$  sufre proporcionalmente una mayor reabsorción que la neoformación ósea observada<sup>170, 173</sup>.

### **6.3 Regeneración ósea y terapia celular.**

La ingeniería tisular representa una opción prometedora en el campo de la regeneración de tejidos dañados<sup>83</sup>. Las MSC son particularmente atractivas porque constituyen una fuente de precursores osteogénicos<sup>174</sup> y porque pueden obtenerse y expandirse in vitro fácilmente. Además, puede guiarse su diferenciación in vivo a través de determinados estímulos como los factores de crecimiento<sup>175-177</sup>.

Existen básicamente dos grandes grupos de células madre que se pueden utilizar en estudios de terapia celular e ingeniería tisular. Células derivadas de tejidos embrionarios y células derivadas de tejidos adultos. Las primeras, a pesar de su mayor potencial regenerativo, presentan una serie de inconvenientes éticos y legales así como una probabilidad mayor de generar neoplasias (teratomas principalmente). Por estos motivos, existe un conocimiento práctico mucho mayor de las células madre obtenidas de individuos adultos.

Las células madre multipotenciales dan lugar a las células progenitoras que tienen una capacidad de autorrenovación mas limitada. Se puede decir que estas células son un escalón intermedio entre las células madre y las células diferenciadas. Presentan como característica, la plasticidad (o versatilidad), ya que pueden diferenciarse hacia fenotipos celulares aunque éstos no pertenezcan específicamente al tejido del que derivan<sup>178</sup>.

Se utilizan distintos tipos de células madre en función del tejido o de los tipos celulares que se pretendan estudiar. De este modo, se sabe que los osteoclastos derivan de las células madre hematopoyéticas (HSC), mientras que los osteoblastos y osteocitos provienen de las MSC situadas en la médula ósea. Una importante característica de las MSC es su capacidad para diferenciarse en múltiples tipos celulares, que dan lugar a tejidos como: hueso, cartílago, tendones o grasa<sup>179-181</sup>.

Otra propiedad clave de las MSC es su capacidad para expandirse rápidamente *in vitro* sin perder sus características progenitoras<sup>182</sup>.

En la práctica clínica, la fuente de MSC mas empleada es el aspirado de cresta iliaca, que es un procedimiento simple y con poca morbilidad<sup>183</sup>.

Se han utilizado diferentes fuentes de células osteoprogenitoras en los ensayos de regeneración ósea, siendo en la mayoría de los casos las MSC la primera opción<sup>184-186</sup>. Esta elección se basaba principalmente en la facilidad para inducir una diferenciación hacia células osteoformadoras en las MSC, y en su bajo potencial inmunogénico, que limita una teórica respuesta inmune en el huésped, además de tener capacidad inmunomoduladora<sup>187</sup>.

#### **6.4 Xenotrasplante y regeneración ósea.**

La terapia con células madre mesenquimales constituye un enfoque prometedor gracias a la gran capacidad de renovación de estas células y su capacidad de diferenciación multilineal modulable por las condiciones adecuadas. Como hemos indicado, son interesantes otras propiedades de las MSC a la hora de utilizarlas en ensayos, como es su capacidad inmunomoduladora, siendo capaces de inhibir la maduración y funciones de células como las NK, linfocitos T y B, células dendríticas, etc. Han mostrado además tener capacidad de eludir el reconocimiento y respuesta inmune de los linfocitos T y NK cuando se implantan en un huésped<sup>188</sup>. Estas propiedades permitieron su empleo en modelos experimentales xenogénicos, como en el presente trabajo.

Existen numerosos estudios en los que se han trasplantado MSC humanas en huésped animales inmunodeprimidos, pero aún está por determinar, de forma clara, si dichas células se pueden utilizar con éxito en animales inmunocompetentes.

Se ha observado que el trasplante de MSC de rata en cuádriceps de ratones inmunocompetentes producía una respuesta inmune, la cual dificultaba la formación de nuevo hueso, aunque en la semana 11 aún se detectaban células en el lugar de implantación<sup>189</sup>.

Un ensayo en el que se implantaron MSC humanas en médula espinal de ratas, reveló una larga supervivencia de las mismas, pero bajo condiciones de inmunosupresión<sup>190</sup>. Sin embargo se han observado datos de pervivencia de MSC humanas cuando se inyectan en ratas con una lesión de médula espinal incluso sin inmunosupresión. Se comprobó además que ayudaron a la recuperación funcional parcial<sup>191</sup>.

Wei *et al*, han comunicado datos de supervivencia a largo plazo de MSC humanas implantadas en el disco intervertebral de ratas sin tratamiento inmunodepresor<sup>192</sup>. Otros autores como Haddad-Mashadrizeh *et al* han encontrado una supervivencia de 90 días de MSC de origen adiposo implantadas en humor vítreo de ratas sin inmunosupresión<sup>193</sup>, y Koellensperger *et al*, encontraron MSC humanas hasta 1 año después de ser implantadas en piel de ratón<sup>194</sup>.

Jin-Young *et al*, obtuvieron una regeneración ósea aceptable de un defecto de 4mm en cráneo de ratas inmunocompetentes tratadas con TCP-β/HA sembrado de MSC humanas a las 8 semanas<sup>195</sup>. A pesar de esto, en la mayoría de los estudios con xenotrasplante de células humanas, lo habitual es encontrar una aceptable supervivencia de las mismas durante aproximadamente las primeras 4 semanas. Para obtener una supervivencia posterior, incluso con una regeneración ósea efectiva, suele ser necesaria la inmunosupresión. Estos hallazgos son a grandes rasgos los obtenidos por Jager *et al* en cóndilos femorales de ratas<sup>196</sup> y por Kim *et al* en artrodesis espinales en conejos<sup>197</sup>.

A pesar de la pervivencia durante semanas de las MSC en los tejidos de los animales, el resultado mas habitual de los ensayos publicados, a pesar de ser satisfactorio, no llegaba a consistir en una regeneración ósea del 100% a las 12 semanas<sup>198</sup>.

### **6.5 Nuestros resultados.**

En ambos grupos de estudio pudimos comprobar que existía algún tipo de regeneración ósea, si bien, los dos grupos tenían una cantidad de hueso nuevo muy diferente. Observamos que en el grupo tratado con TCP-β y MSC

se obtenía una reparación mucho mayor de la lesión que en el grupo del TCP. A pesar de ello la regeneración en el grupo de las MSC no era completa, y a las 12 semanas persistía aún cierta cantidad de defecto sin reparar. Esto concuerda en gran medida con la mayoría de estudios similares que hemos consultado en la búsqueda bibliográfica, si bien es cierto que la mayoría de estos estudios se realizaron en animales inmunodeprimidos, hecho que los diferencia de nuestro trabajo.

Basándonos en la situación de inmuno-privilegio de la que gozan las MSC, quisimos comprobar si éstas eran capaces de favorecer la reparación del defecto óseo en un animal inmunocompetente, cosa que finalmente logramos demostrar. Es mas, durante el análisis histológico a las 12 semanas, se pudo observar células sin morfología de células óseas y que probablemente correspondan a MSC humanas (positivas al marcaje con anticuerpos específicos anti-mitocondria humana) aún viables y en proceso de diferenciación a osteoblastos u osteocitos. En la mayoría de los estudios que hemos consultado, para lograr una pervivencia de las células xenotrasplantadas, a partir de la cuarta semana recurren a la inmunosupresión.

Otro hecho que pudimos comprobar es que la adición de MSC al soporte o carrier, favorecía la integración del mismo a medida que se formaba nuevo hueso.

### **6.6 Perspectivas de futuro de la ingeniería tisular.**

La utilización de MSC, factores osteoinductores y sistemas de andamiaje en el contexto de la ingeniería tisular ofrece grandes expectativas en el desarrollo de estrategias para reparar grandes defectos óseos. A pesar de ello, sólo una pequeña fracción de los hallazgos en ensayos clínicos es aplicable a la práctica clínica habitual. En parte, este hecho se puede deber a que diferentes áreas necesitan ser mejoradas<sup>199-201</sup>:

- Obtener una mejor liberación de factores de crecimiento, en cuanto a dosis y momento de liberación se refiere.



- Mejor control de la expresión génica, utilizando vectores celulares mas seguros, efectivos y predecibles (a poder ser sin utilizar virus).
- Optimización del cultivo celular, que acorten el tiempo requerido para la expansión de las MSC.
- Desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento que permitan la inmediata implantación in vivo de las MSC, sin necesidad de cultivarlas previamente.
- Desarrollo de soportes estructurales biomiméticos.
- Proceso de obtención, cultivo, implantación, etc con costes viables para la práctica clínica habitual.
- Realización de ensayos clínicos con un mayor tamaño muestral y con sujetos control, especialmente ensayos en fase III. Hay que tener en cuenta también el hecho de que muchos de los pacientes que se someten a terapias novedosas o en desarrollo, suelen ser casos mas complejos o con varias cirugías previas fallidas.
- Avanzar en el conocimiento de los problemas éticos, legales y técnicos, incluyendo el uso de células de origen embrionario, y derivadas de células reprogramadas (iPS).

A pesar de estos retos, actualmente, el conocimiento y la tecnología, brindan una excepcional oportunidad para trasladar los hallazgos de los estudios preclínicos a terapias viables para la regeneración ósea en la clínica habitual.

## **CONCLUSIONES**

## **7. Conclusiones.**

### **7.1 Respecto a la hipótesis de trabajo.**

El empleo de MSC humanas sobre un soporte de TCP- $\beta$  es capaz de inducir la reparación de una lesión ósea crítica mediante regeneración en un modelo de xenotrasplante en conejos inmunocompetentes, aunque no lo consigue al 100%.

### **7.2 Respecto a los objetivos del trabajo.**

Las MSC humanas son capaces de sobrevivir y permanecer viables cuando se siembran en un soporte de TCP- $\beta$ .

La asociación de TCP- $\beta$  y MSC produce una regeneración ósea del defecto óseo a nivel macroscópico y microscópico, observándose una proliferación y diferenciación de las MSC hacia estirpe osteogénica.

La asociación TCP- $\beta$  y MSC es superior al TCP- $\beta$  aislado en cuanto a regeneración ósea.

Las MSC humanas obtenidas de MO, son capaces de pervivir durante 12 semanas y contribuir a la integración del injerto cuando son implantadas en conejos New Zealand inmunocompetentes.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 8. Bibliografía

1. Kaplan FS, Hayes WC, Keaveny TM. Forma y función del hueso. In: Simon SR, editor. *Ciencias básicas en Ortopedia*. Barcelona: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1997.
2. Shane E, Bilezikian JP. Normal bone and mineral homeostasis. In: Bigvoet O, Fleisch HA, Cunfield RE, Russel G, editors. *Biphosphonates on bones*. Amsterdam: 1995:3-21.
3. Gokhale JA, Boskey AL, Robey PG. The biochemistry of bone. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press; 2001:107-188.
4. Triffit JT. The organic matrix of bone tissue. In: Urist MR, editor. *Fundamental and clinical bone physiology*. Philadelphia: JB Lippincott; 1980:45-82.
5. Lian JB, Stein GS. Osteoblast biology. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press; 2001:21-71.
6. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 1982;34(3):311.
7. Bonucci E. New knowledge on the origin, function and fate of osteoclasts. *Clin Orthop Relat Res* 1981;(158):252-269.
8. Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthop Relat Res* 1988;(231):239-271.
9. Blair HC, Kahn AJ, Crouch EC, Jeffrey JJ, Teitelbaum SL. Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J Cell Biol* 1986;102(4):1164-1172.
10. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 1994;55(3):287-299.
11. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone* 1992;13 Suppl 1:S3-S6.
12. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res* 1991;(263):30-48.
13. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *Biology and clinical applications*. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A(6):1032-1044.
14. Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand* 1996;67(4):407-417.

15. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 1983;220(4598):680-686.
16. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 1(Pt 1):S1-S6.
17. Torzilli PA, Burstein AH, Takebe K. The mechanical and structural properties of maturing bone. In: Cowen SC, editor. *Mechanical properties of bone*. New York: American Society of Mechanical Engineers; 1981:145-161.
18. Govender S, Csimma C, Genant HK et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A(12):2123-2134.
19. Hooper G. Bone as tissue. In: Hughes SPF, Benson MKD, Colton CL, editors. *Orthopaedics. The principles and practice of musculoskeletal surgery and fractures*. London: Churchill Livingstone; 1987:1-14.
20. Glimcher MJ. The nature of the mineral component of bone and the mechanisms of calcification. In: Coe FL, Favus MJ, editors. *Disorders of bone and mineral metabolism*. New York: Raven Press; 1992:265-286.
21. Forriol F. El hueso como tejido y como órgano. In: Fundación SECOT, editor. *Ciencias básicas aplicadas a la cirugía ortopédica*. Madrid: Drug Farma; 1999:83-92.
22. Kerr A. Embryology and development of bone. In: Hugues SPF, Benson MKD, Colton CL, editors. *Orthopaedics. The principles and practice of musculoskeletal surgery and fractures*. London: Churchill Livingstone; 1987:1-14.
23. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. Part II: formation, form, modelling, remodelling and regulation of cell function. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77A:1276-1289.
24. Corres González J. Remodelado óseo. In: Nollá Solés J, editor. *Enfermedades óseas*. Barcelona: Masson; 1997:25-33.
25. Haberland M, Schilling AF, Rueger JM, Amling M. Brain and bone: central regulation of bone mass. A new paradigm in skeletal biology. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A(12):1871-1876.
26. Parfitt AM. Integration of skeletal and mineral homeostasis. In: De Luca H, Frost F, Jee W, Johnston C, Parfitt AM, editors. *Osteoporosis: recent advances in pathogenesis and treatment*. Baltimore: University park; 1981:115-126.
27. Parfitt AM. The physiologic and pathogenetic significance of bone histomorphometric data. In: Coe FL, Favus MJ, editors. *Disorders of bone and mineral metabolism*. New York: Raven Press; 1992:475-489.

28. Chambers TJ, Fuller K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci* 1985;76:155-165.
29. Parfitt AM. Pharmacologic manipulation of bone remodeling and calcium and homeostasis. In: Kanis JA, editor. *Progress in basic and clinical pharmacology*. Vol 4: Calcium metabolism. Basel: Karger; 1990:1-27.
30. Chambers TJ. The cellular basis of bone resorption. *Clin Orthop Relat Res* 1980;(151):283-293.
31. Parfitt AM. Mini-review. The mechanism of coupling - A role for the vasculature. *Bone* 1998;26:319-323.
32. Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrazi MD, Doleman SE, Klagsbrun M. Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem* 1986;261(27):12665-12674.
33. Mundy GR, Oyajobi B, Trainedes K, Dallas S, Chen S. Cytokines and bone remodeling. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press; 2001:373-404.
34. Chan GK, Duque G. Age-related bone loss: old bone, new facts. *Gerontology* 2002;48(2):62-71.
35. Lips P, Courpron P, Meunier PJ. Mean wall thickness of trabecular bone packets in the human iliac crest: changes with age. *Calcif Tissue Res* 1978;26(1):13-17.
36. Chavassieux P, Meunier PJ. [Mechanisms of bone loss in osteoporosis]. *Rev Prat* 1995;45(9):1083-1088.
37. Aaron JE, Makins NB, Sagreiya K. The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women. *Clin Orthop Relat Res* 1987;(215):260-271.
38. Mellish RW, Garrahan NJ, Compston JE. Age-related changes in trabecular width and spacing in human iliac crest biopsies. *Bone Miner* 1989;6(3):331-338.
39. Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest* 1983;72(4):1396-1409.
40. Weinstein RS, Hutson MS. Decreased trabecular width and increased trabecular spacing contribute to bone loss with aging. *Bone* 1987;8(3):137-142.

41. Campana V, Milano G, Pagano E et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med* 2014;25(10):2445-2461.
42. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005;36 Suppl 3:S20-S27.
43. Staubli AE, De SC, Babst R, Lobenhoffer P. TomoFix: a new LCP-concept for open wedge osteotomy of the medial proximal tibia--early results in 92 cases. *Injury* 2003;34 Suppl 2:B55-B62.
44. Paley D, Herzenberg JE, Paremian G, Bhave A. Femoral lengthening over an intramedullary nail. A matched-case comparison with Ilizarov femoral lengthening. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79(10):1464-1480.
45. Greshaw AH. *Campbell's Operative Orthopaedics*. 11 ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2008.
46. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg* 1995;3(1):1-8.
47. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A(3):454-464.
48. Yoshikawa T. Bone reconstruction by cultured bone graft. *Materials Science and Engineering* 2000;(13):29-37.
49. Sung HJ, Meredith C, Johnson C, Galis ZS. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* 2004;25(26):5735-5742.
50. Weir NA, Buchanan FJ, Orr JF, Dickson GR. Degradation of poly-L-lactide. Part 1: in vitro and in vivo physiological temperature degradation. *Proc Inst Mech Eng H* 2004;218(5):307-319.
51. Friedestein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone-marrow osteogenic stem-cells - in vitro cultivation and transplantation in diffusion-chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987;(20):263-272.
52. Vunjak-Novakovic G, Goldstein SA. *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechanology*. 3 ed. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins; 2005.
53. Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 1999;30(4):571-581.
54. Dick HM, Strauch RJ. Infection of massive bone allografts. *Clin Orthop Relat Res* 1994;(306):46-53.



55. Yue WM, Tay BK, Kasinathan ST. Patellar allografts in anterior cervical fusion - a two-year clinical and radiographic study. *Singapore Med J* 2003;44(10):521-525.
56. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;21(24):2529-2543.
57. Mendes SC, Bezemer J, Claase MB et al. Evaluation of two biodegradable polymeric systems as substrates for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2003;9 Suppl 1:S91-101.
58. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000;21(23):2335-2346.
59. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989;3(3):192-195.
60. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 2003;22(1):81-91.
61. Hubbell JA. Bioactive biomaterials. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10(2):123-129.
62. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996;(17):93-102.
63. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 2014;(26):441-443.
64. Wei G, Ma PX. Macroporous and nanofibrous polymer scaffolds and polymer/bone-like apatite composite scaffolds generated by sugar spheres. *J Biomed Mater Res A* 2006;78(2):306-315.
65. Huang H, Miao X. Novel porous hydroxyapatite prepared by combining H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foaming with PU sponge and modified with PLGA and bioactive glass. *Journal Biomaterial Applications* 2006.
66. Laurencin CT, Attawia MA, Lu LQ et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells: a regional gene therapy approach to bone regeneration. *Biomaterials* 2001;22(11):1271-1277.
67. Le ND, Guehenec LL, Rouillon T et al. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27(13):2716-2722.
68. Meretoja VV, Helminen AO, Korventausta JJ, Haapa-aho V, Seppala JV, Narhi TO. Crosslinked poly(epsilon-caprolactone/D,L-lactide)/bioactive glass composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2006;77(2):261-268.

69. Ramay HR, Zhang M. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25(21):5171-5180.
70. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27(18):3413-3431.
71. Thomas V, Jagani S, Johnson K et al. Electrospun bioactive nanocomposite scaffolds of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for bone tissue engineering. *J Nanosci Nanotechnol* 2006;6(2):487-493.
72. Vlakh EG, Panarin EF, Tennikova TB, Suck K, Kasper C. Development of multifunctional polymer-mineral composite materials for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2005;75(2):333-341.
73. Yang XB, Webb D, Blaker J et al. Evaluation of human bone marrow stromal cell growth on biodegradable polymer/bioglass composites. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342(4):1098-1107.
74. Groeneveld EH, van den Bergh JP, Holzmann P, ten Bruggenkate CM, Tuinzing DB, Burger EH. Mineralization processes in demineralized bone matrix grafts in human maxillary sinus floor elevations. *J Biomed Mater Res* 1999;48(4):393-402.
75. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21(23):2347-2359.
76. Lossdorfer S, Schwartz Z, Wang L et al. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J Biomed Mater Res A* 2004;70(3):361-369.
77. Boyce ST. Skin substitutes from cultured cells and collagen-GAG polymers. *Med Biol Eng Comput* 1998;36(6):791-800.
78. Matsumura K, Hyon SH, Nakajima N, Peng C, Tsutsumi S. Surface modification of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) (EVA). Part I. Introduction of carboxyl groups and immobilization of collagen. *J Biomed Mater Res* 2000;50(4):512-517.
79. Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 1991;99 ( Pt 1):131-139.
80. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005;352(19):1959-1966.
81. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19(3):180-192.

82. McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO et al. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif* 2005;38(4):245-255.
83. Komaki M, Iwasaki K, Morita I. [Bone and Stem Cells. Mesenchymal stem cells and bone regeneration]. *Clin Calcium* 2014;24(4):565-573.
84. Filvaroff E, Erlebacher A, Ye J et al. Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development* 1999;126(19):4267-4279.
85. Oakes BW. Orthopaedic tissue engineering: from laboratory to the clinic. *Med J Aust* 2004;180(5 Suppl):S35-S38.
86. Langer R. New methods of drug delivery. *Science* 1993;(260):926.
87. Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991;113(5):981-986.
88. Jansen JA, Vehof JW, Ruhe PQ et al. Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. *J Control Release* 2005;101(1-3):127-136.
89. Endo M, Kuroda S, Kondo H, Maruoka Y, Ohya K, Kasugai S. Bone regeneration by modified gene-activated matrix: effectiveness in segmental tibial defects in rats. *Tissue Eng* 2006;12(3):489-497.
90. Lin CY, Schek RM, Mistry AS et al. Functional bone engineering using ex vivo gene therapy and topology-optimized, biodegradable polymer composite scaffolds. *Tissue Eng* 2005;11(9-10):1589-1598.
91. Schek RM, Wilke EN, Hollister SJ, Krebsbach PH. Combined use of designed scaffolds and adenoviral gene therapy for skeletal tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27(7):1160-1166.
92. Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1997;36(1):17-28.
93. Martin I, Shastri VP, Padera RF et al. Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams. *J Biomed Mater Res* 2001;55(2):229-235.
94. Kakudo N, Shimotsuma A, Miyake S, Kushida S, Kusumoto K. Bone tissue engineering using human adipose-derived stem cells and honeycomb collagen scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2008;84(1):191-197.
95. Kim HJ, Kim UJ, Vunjak-Novakovic G, Min BH, Kaplan DL. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials* 2005;26(21):4442-4452.

96. Lee JH, Rhie JW, Oh DY, Ahn ST. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells (hASCs) in a porous three-dimensional scaffold. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;370(3):456-460.
97. Meinel L, Karageorgiou V, Hofmann S et al. Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2004;71(1):25-34.
98. Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann Biomed Eng* 2004;32(1):112-122.
99. Ng AM, Tan KK, Phang MY et al. Differential osteogenic activity of osteoprogenitor cells on HA and TCP/HA scaffold of tissue engineered bone. *J Biomed Mater Res A* 2008;85(2):301-312.
100. Gravel M, Gross T, Vago R, Tabrizian M. Responses of mesenchymal stem cell to chitosan-coraline composites microstructured using coraline as gas forming agent. *Biomaterials* 2006;27(9):1899-1906.
101. Xu C, Wang Y, Yu X. Evaluation of human mesenchymal stem cells response to biomimetic bioglass-collagen-hyaluronic acid-phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2008.
102. Zhao F, Grayson WL, Ma T, Bunnell B, Lu WW. Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan-gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development. *Biomaterials* 2006;27(9):1859-1867.
103. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2004;22(2):80-86.
104. Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, Mikos AG. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials* 1998;19(15):1405-1412.
105. Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol Bioeng* 2003;84(2):205-214.
106. Tang K, Dang G, Guo Z. [The effects of intermittent hydromechanics on the differentiation and function of bone marrow stromal derived-osteoblasts in porous calcium phosphate ceramics]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002;82(10):665-668.
107. Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC, Mikos AG. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* 2001;22(11):1279-1288.

108. Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res* 2002;62(1):136-148.
109. Braccini A, Wendt D, Jaquiere C et al. Three-dimensional perfusion culture of human bone marrow cells and generation of osteoinductive grafts. *Stem Cells* 2005;23(8):1066-1072.
110. Datta N, Pham QP, Sharma U, Sikavitsas VI, Jansen JA, Mikos AG. In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(8):2488-2493.
111. Holtorf HL, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Ann Biomed Eng* 2005;33(9):1238-1248.
112. Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stroma cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone. *J Biomed Mater Res A* 2005;72(3):326-334.
113. Scaglione S, Braccini A, Wendt D et al. Engineering of osteoinductive grafts by isolation and expansion of ovine bone marrow stromal cells directly on 3D ceramic scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2006;93(1):181-187.
114. Sikavitsas VI, Bancroft GN, Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(25):14683-14688.
115. Sikavitsas VI, Bancroft GN, Lemoine JJ, Liebschner MA, Dauner M, Mikos AG. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann Biomed Eng* 2005;33(1):63-70.
116. Bioreactor culture of anatomically-shaped mandibular condyles. Orthopaedic Research Society Conference; San Francisco, USA: 2008.
117. Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant* 1992;1(1):23-32.
118. Hanada K, Dennis JE, Caplan AI. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 1997;12(10):1606-1614.

119. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992;13(1):81-88.
120. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K et al. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 1997;12(9):1335-1347.
121. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 1997;63(8):1059-1069.
122. Braccini A, Wendt D, Farhadi J, Schaeren S, Heberer M, Martin I. The osteogenicity of implanted engineered bone constructs is related to the density of clonogenic bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1(1):60-65.
123. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007;13(5):947-955.
124. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344(5):385-386.
125. Caradano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 2003;(8):980-989.
126. Kawamura K, Yajima H, Ohgushi H et al. Experimental study of vascularized tissue-engineered bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(5):1471-1479.
127. Arkudas A, Beier JP, Heidner K et al. Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng* 2007;13(7):1549-1560.
128. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9(6):685-693.
129. Laschke MW, Harder Y, Amon M et al. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 2006;12(8):2093-2104.
130. Peters MC, Poverini PJ, Mooney DJ. Engineering vascular networks in porous polymer matrices. *J Biomed Mater Res* 2002;60(4):668-678.
131. Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Miner Res* 2005;20(5):848-857.

132. Zigdon-Giladi H, Bick T, Lewinson D, Machtei EE. Co-Transplantation of Endothelial Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells Promote Neovascularization and Bone Regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013.
133. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004;110(3):349-355.
134. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004;109(5):656-663.
135. Valarmathi MT, Yost MJ, Goodwin RL, Potts JD. A three-dimensional tubular scaffold that modulates the osteogenic and vasculogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 2008;14(4):491-504.
136. Bulnheim U, Müller P, Neumann HG et al. Endothelial cells stimulate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med* 2014;8(10):831-840.
137. Unger RE, Sartoris A, Peters K et al. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 2007;28(27):3965-3976.
138. Choong CS, Huttmacher DW, Triffitt JT. Co-culture of bone marrow fibroblasts and endothelial cells on modified polycaprolactone substrates for enhanced potentials in bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2006;12(9):2521-2531.
139. Rouwkema J, de B.J., van Blitterswijk CA. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng* 2006;12(9):2685-2693.
140. Meury T, Verrier S, Alini M. Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts in vitro by interfering with osterix expression. *J Cell Biochem* 2006;98(4):992-1006.
141. Lanza RG, Gearhart J, Hogan B et al. *Essentials of stem cell biology*. 2 ed. Oxford: Elsevier's Inc; 2006.
142. Liu N, Lu M, Tian X, Han Z. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 2007;211(2):279-286.
143. Mountford JC. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfus Med* 2008;18(1):1-12.

144. Denker HW. Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources. *J Med Ethics* 2006;32(11):665-671.
145. Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells* 2009;27(5):1050-1056.
146. Trounson A. New perspectives in human stem cell therapeutic research. *BMC Med* 2009;7:29.
147. Krampera M, Franchini M, Pizzolo G, Aprili G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus* 2007;5(3):120-129.
148. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425(6960):841-846.
149. Lam BS, Adams GB. Hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow stem cell niche. *Int J Lab Hematol* 2010;32(6 Pt 2):551-558.
150. Zhang J, Niu C, Ye L et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;425(6960):836-841.
151. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda )* 2005;20:349-356.
152. Bianco P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood* 2011;117(20):5281-5288.
153. Levesque JP, Helwani FM, Winkler IG. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia* 2010;24(12):1979-1992.
154. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;251:3-11.
155. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001;7(6):259-264.
156. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 2007;67(19):9142-9149.
157. Herrero C, Perez-Simon JA. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* 2010;43(5):425-430.
158. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006;36(10):2566-2573.



159. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006;20(3):161-171.
160. Dominici M, Le BK, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-317.
161. Di MN, Piccinini E, Jaworski M, Trumpp A, Wendt DJ, Martin I. Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems. *Biomaterials* 2011;32(2):321-329.
162. Fujita A, Migita M, Ueda T, Ogawa R, Fukunaga Y, Shimada T. Hematopoiesis in regenerated bone marrow within hydroxyapatite scaffold. *Pediatr Res* 2010;68(1):35-40.
163. Bagley J, Rosenzweig M, Marks DF, Pykett MJ. Extended culture of multipotent hematopoietic progenitors without cytokine augmentation in a novel three-dimensional device. *Exp Hematol* 1999;27(3):496-504.
164. de Barros AP, Takiya CM, Garzoni LR et al. Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model. *PLoS One* 2010;5(2):e9093.
165. Nichols JE, Cortiella J, Lee J et al. In vitro analog of human bone marrow from 3D scaffolds with biomimetic inverted colloidal crystal geometry. *Biomaterials* 2009;30(6):1071-1079.
166. Tan J, Liu T, Hou L et al. Maintenance and expansion of hematopoietic stem/progenitor cells in biomimetic osteoblast niche. *Cytotechnology* 2010;62(5):439-448.
167. Oryan A, Bigham-Sadegh A, Abbasi-Teshnizi F. Effects of osteogenic medium on healing of the experimental critical bone defect in a rabbit model. *Bone* 2014;63:53-60.
168. Verbicaro T, Giovanini AF, Zielak JC, Baratto FF, de Araujo MR, Deliberador TM. Osteocalcin immunohistochemical expression during repair of critical-sized bone defects treated with subcutaneous adipose tissue in rat and rabbit animal model. *Braz Dent J* 2013;24(6):559-564.
169. Guo X, Zheng Q, Kulbatski I et al. Bone regeneration with active angiogenesis by basic fibroblast growth factor gene transfected mesenchymal stem cells seeded on porous beta-TCP ceramic scaffolds. *Biomed Mater* 2006;1(3):93-99.
170. Bodde EW, Wolke JG, Kowalski RS, Jansen JA. Bone regeneration of porous beta-tricalcium phosphate (Conduit TCP) and of biphasic calcium phosphate ceramic (Biosel) in trabecular defects in sheep. *J Biomed Mater Res A* 2007;82(3):711-722.

171. Harris CT, Cooper LF. Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis. *J Biomed Mater Res A* 2004;68(4):747-755.
172. Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2005;26(17):3587-3596.
173. Yamada S, Heymann D, Bouler JM, Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* 1997;18(15):1037-1041.
174. Fujita M, Kinoshita Y, Sato E et al. Proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells on poly(glycolic acid)-collagen sponge. *Tissue Eng* 2005;11(9-10):1346-1355.
175. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-147.
176. Reddi AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng* 2000;6(4):351-359.
177. Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop* 2013;37(12):2491-2498.
178. Lee K, Chan CK, Patil N, Goodman SB. Cell therapy for bone regeneration--bench to bedside. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;89(1):252-263.
179. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9(5):641-650.
180. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21(3):429-435.
181. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A(7):1541-1558.
182. Deasy BM, Gharaibeh BM, Pollett JB et al. Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol Biol Cell* 2005;16(7):3323-3333.
183. Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79(11):1699-1709.
184. Cowan CM, Soo C, Ting K, Wu B. Evolving concepts in bone tissue engineering. *Curr Top Dev Biol* 2005;66:239-285.
185. Hutmacher DW, Garcia AJ. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. *Gene* 2005;347(1):1-10.

186. Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V et al. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res* 2005;8(4):277-284.
187. Niedhart C, Maus U, Miltner O, Graber HG, Niethard FU, Siebert CH. The effect of basic fibroblast growth factor on bone regeneration when released from a novel in situ setting tricalcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res A* 2004;69(4):680-685.
188. Gu H, Xiong Z, Yin X et al. Bone regeneration in a rabbit ulna defect model: use of allogeneic adipose-derived stem cells with low immunogenicity. *Cell Tissue Res* 2014;358(2):453-464.
189. Wang Y, Chen X, Armstrong MA, Li G. Survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenotransplantation model. *J Orthop Res* 2007;25(7):926-932.
190. Ronsyn MW, Daans J, Spaepen G et al. Plasmid-based genetic modification of human bone marrow-derived stromal cells: analysis of cell survival and transgene expression after transplantation in rat spinal cord. *BMC Biotechnol* 2007;7:90.
191. Cizkova D, Rosocha J, Vanicky I, Jergova S, Cizek M. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Mol Neurobiol* 2006;26(7-8):1167-1180.
192. Wei A, Tao H, Chung SA, Brisby H, Ma DD, Diwan AD. The fate of transplanted xenogeneic bone marrow-derived stem cells in rat intervertebral discs. *J Orthop Res* 2009;27(3):374-379.
193. Haddad-Mashadrizeh A, Bahrami AR, Matin MM et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells can survive and integrate into the adult rat eye following xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2013;20(3):165-176.
194. Koellensperger E, Lampe K, Beierfuss A, Gramley F, Germann G, Leimer U. Intracutaneously injected human adipose tissue-derived stem cells in a mouse model stay at the site of injection. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2014;67(6):844-850.
195. Im JY, Min WK, You C, Kim HO, Jin HK, Bae JS. Bone regeneration of mouse critical-sized calvarial defects with human mesenchymal stem cells in scaffold. *Lab Anim Res* 2013;29(4):196-203.
196. Jager M, Degistirici O, Knipper A, Fischer J, Sager M, Krauspe R. Bone healing and migration of cord blood-derived stem cells into a critical size femoral defect after xenotransplantation. *J Bone Miner Res* 2007;22(8):1224-1233.
197. Kim HJ, Park JB, Lee JK et al. Transplanted xenogenic bone marrow stem cells survive and generate new bone formation in the posterolateral

- lumbar spine of non-immunosuppressed rabbits. *Eur Spine J* 2008;17(11):1515-1521.
198. Becerra J, Andrades JA, Santamaria JA, Cifuentes M, Guerado E. [Bone regeneration, cell therapy and tissue engineering]. *Med Clin (Barc)* 2001;116(1):23-34.
  199. Knight MN, Hankenson KD. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013;2(6):306-316.
  200. Wang Y, Yin Y, Jiang F, Chen N. Human amnion mesenchymal stem cells promote proliferation and osteogenic differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Mol Histol* 2015;46(1):13-20.
  201. Sato K, Itoh T, Kato T et al. Serum-free isolation and culture system to enhance the proliferation and bone regeneration of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2015.