



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Aplicaciones de Células Madre Mesenquimales (MSCs) en la reparación y regeneración del tejido óseo.

Application of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in bone repair and regeneration.

Autora: Susana Quintanilla Cavia

Directora: Flor M. Pérez-Campo

Santander, Junio 2017

ÍNDICE

RESUMEN/ ABSTRACT	2
OBJETIVOS Y METODOLOGÍA.....	3
ABREVIATURAS	4
1. INTRODUCCIÓN A LA INGENIERÍA TISULAR.....	5
1.1. Concepto.....	5
1.2. Historia e importancia de la Ingeniería Tisular.....	5
1.3. Bases de las técnicas de regeneración del tejido óseo.....	7
1.4. Biomateriales. Clasificación, aplicaciones y propiedades.....	9
1.5. Células madre.....	10
2. PROCESOS DE OSIFICACIÓN Y OSTEOGÉNESIS.....	12
2.1. Composición del hueso.....	12
2.2. Proceso de Remodelado óseo.....	12
2.3. Células madre mesenquimales (MSCs) y su capacidad osteoformadora.....	16
2.4. Ventajas del uso de células madre en la ingeniería del tejido óseo frente a las técnicas clásicas.....	17
2.5. Importancia de procesos de osteoinducción / osteoconducción en la regeneración ósea.....	18
3. PATOLOGÍAS QUE CURSAN CON PÉRDIDA DE MASA ÓSEA.....	20
3.1. Osteonecrosis.....	20
3.2. Tumores óseos.....	21
3.3. Osteoporosis.....	22
4. PRINCIPIOS MOLECULARES DE ACTUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS (BMPs).....	25
4.1. Biología de las BMPs.....	25
4.2. Uso de factores de crecimiento (BMPs) en Ingeniería del tejido óseo.....	26
5. TIPOS DE SCAFFOLDS, CARACTERÍSTICAS, VENTAJAS E INCONVENIENTES.....	28
5.1. Características de los biomateriales.....	28
5.2. Tipos de biomateriales.....	29
5.3. Scaffolds tipo gel vs scaffolds tradicionales en la regeneración ósea.....	31
6. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	32
7. BIBLIOGRAFÍA.....	34
AGRADECIMIENTOS	37

RESUMEN

Las células madre mesenquimales humanas (hMSCs) son un tipo de células multipotentes presentes en tejidos adultos que tienen capacidad para diferenciarse, tanto *in vivo* como *in vitro*, pudiendo dar lugar a varios tipos celulares, incluyendo osteocitos, condrocitos y adipocitos. Estas propiedades hacen de las MSCs, junto con el desarrollo de biomateriales, una de las piezas clave en la investigación en Ingeniería de Tejidos. La combinación de estos dos elementos con factores de crecimiento capaces de inducir formación de hueso, cartílago y tejido conectivo, podrían llevar al desarrollo de terapias de primera línea para la regeneración ósea. Estas terapias serían aplicables al tratamiento de fracturas de tamaño crítico o de enfermedades que cursan con pérdida de masa ósea, tales como la osteonecrosis, tumores óseos o la osteoporosis, que constituye un gran problema sanitario en la sociedad actual.

Palabras clave: células madre, regeneración ósea, factores de crecimiento, biomateriales, Ingeniería de Tejidos.

ABSTRACT

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are a type of multipotent stem cells present in adult tissues, that have the ability to differentiate, both *in vivo* and *in vitro*, into different cell types, including osteocytes, chondrocytes and adipocytes. Thanks to these properties hMSCs are, together with biomaterials, one of the key pieces in Cell and Tissue Engineering research. The combination of these two elements with growth factors used to induce the formation of bone, cartilage or connective tissue, could lead to the development of first-line treatments for bone regeneration. These treatments could be applied to critical-size fractures or diseases associated to loss of bone mass, such as osteonecrosis, bone tumors or osteoporosis, which currently constitutes a major health problem in our society.

Key words: stem cells, bone regeneration, growth factors, biomaterials, Tissue Engineering.

OBJETIVOS Y METODOLOGIA

El objetivo principal de este trabajo es estudiar los factores fundamentales para el desarrollo de las técnicas actuales de ingeniería del tejido óseo (células madre mesenquimales, materiales bioportadores y factores de crecimiento), así como analizar cuáles son las perspectivas de futuro de dichas técnicas. Además, nos proponemos describir la evolución y el desarrollo de los biomateriales en biomedicina durante las últimas décadas, y profundizar en las propiedades intrínsecas del hueso, el proceso de osteogénesis y las características de las patologías asociadas con pérdida de masa ósea.

Para ello, se ha realizado una revisión bibliográfica sobre la Ingeniería de Tejidos en el sentido amplio del concepto y sus aplicaciones clínicas en la actualidad. Posteriormente, este trabajo se ha centrado en los aspectos relacionados con la regeneración del hueso, un campo en auge debido a la alta incidencia en la población actual, de patologías que cursan con pérdida de masa ósea y para las cuales el uso combinado de células madre y de biomateriales es una solución cada vez con más tasa de éxito.

La base de datos de referencia para la realización del trabajo ha sido PubMed, ya que agrupa la mayor parte de las publicaciones relacionadas con las bases moleculares y avances clínicos en el campo de la regeneración ósea. En general, se han escogido las publicaciones más recientes y se han consultado numerosas revisiones bibliográficas. También se ha recurrido a libros especializados y monografías, sobre todo para el marco más teórico de los temas clínicos y de fisiología. Todas estas referencias se incluyen en el apartado de Bibliografía del presente trabajo, identificadas de forma numerada, siendo de esta manera citadas a lo largo del texto. Para este cometido se ha utilizado el programa informático EndNote.

ABREVIATURAS

ASCs	(Adult Stem Cells) Células madre de tejidos adultos
BMPR	(Bone Morphogenetic Protein Receptor) Receptor de Proteínas Morfogenéticas del hueso
BMPs	(Bone Morphogenetic Proteins) Proteínas Morfogenéticas del hueso
EMA	(European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) Agencia Europea del Medicamento
HLA	(Human Leukocyte Antigen) Antígenos Leucocitarios Humanos, Histocompatibilidad
hMSCs	(human Mesenchymal Stem Cells) Células madre mesenquimales humanas
ISCT	International Society for Cellular Therapy Sociedad Internacional de Terapia Celular
IT	Ingeniería Tisular o Ingeniería de Tejidos
MSCs	(Mesenchymal Stem Cells) Células madre mesenquimales
ONCF	Osteonecrosis de cabeza femoral
PTH	(Parathormona) Hormona paratiroidea
SERMs	(Selective Estrogen Receptor Modulators) Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos
TGF β	(Transforming growth factor beta) Factor de crecimiento transformante beta
VIH	(Human Immunodeficiency Virus) Virus de la inmunodeficiencia humana

1. INTRODUCCIÓN A LA INGENIERÍA TISULAR.

1.1. Concepto.

El término Tissue Engineering (Ingeniería Tisular o Ingeniería de Tejidos, IT) fue adjudicado a esta disciplina en 1987, durante una reunión de la Fundación Nacional de Ciencias de la Medicina Humana en Estados Unidos.

La Ingeniería Tisular (IT en adelante), es una especialidad de la Biomedicina, cuyo objetivo principal es el diseño de estructuras biológicas funcionales para sustituir, reparar o regenerar tejidos dañados, ya sea parcialmente o en su totalidad.

La IT es un área altamente interdisciplinar, ya que precisa de la colaboración de expertos en ciencias de la vida, químicos, físicos e ingenieros para resolver problemas clínicos y quirúrgicos, puesto que, en síntesis, la IT usa células cultivadas en el laboratorio, o incluso modificadas genéticamente, como un material de ingeniería. El término "Ingeniería", en este contexto, agrupa las estrategias usadas para la formación de estructuras funcionales, es decir, los factores necesarios para la regeneración del tejido dañado (células, biomateriales y factores de crecimiento) y la interacción entre todos ellos. El primer desafío al encarar las investigaciones en este campo es lograr la combinación óptima de estos elementos para el tratamiento de un problema clínico particular.

La IT es, por tanto, una disciplina muy amplia y en continuo desarrollo. En este trabajo, se va a describir la parte de la IT relacionada con el tejido óseo y la regeneración de hueso con fines terapéuticos.

1.2. Historia e importancia de la Ingeniería Tisular.

En 1890 se realizó el primer reemplazo total de cadera con una prótesis de marfil, aunque la IT comenzó a desarrollarse más propiamente en el siglo XIX con la implantación de dispositivos **metálicos** para fijar fracturas. Estos dispositivos metálicos siguieron siendo el material más utilizado en diversas aplicaciones médicas hasta mediados del siglo XX.

A partir de los años 50, comenzaron a diseñarse dispositivos basados en polímeros sintéticos, que evolucionaron rápidamente debido a su gran potencial. En la década de los 60, apareció la primera generación de polímeros de origen orgánico. Durante este tiempo, el objetivo principal de la investigación en este campo era obtener materiales cuyas propiedades físicas y mecánicas se adaptaran lo mejor posible a las del tejido a reemplazar, y que además reaccionaran mínimamente con el tejido circundante, es decir, materiales bioinertes. Posteriormente, entrados los años 80, surge una segunda generación de biomateriales, los materiales cerámicos **bioactivos**, que se enlazan químicamente con el tejido vivo que

les rodea, aunque sus características mecánicas son inferiores a las de las cerámicas bioinertes. En esta década, también comienzan a desarrollarse los materiales llamados **bioabsorbibles**, que pueden ser reabsorbidos y metabolizados por el organismo, y los **biodegradables**, que son aquellos que se descomponen con el paso del tiempo sin causar toxicidad. Estos últimos hallazgos supusieron un gran avance, ya que ahora sabemos que cuando un material no es biocompatible, su introducción en el organismo puede generar numerosas complicaciones, tales como inflamación, granulomas, rechazo o necrosis, entre otras.

Todo este desarrollo y las posibilidades clínicas que brindaba quedaron patentes en el incremento del número de publicaciones registradas desde finales de los 80 hasta finales de los 90 (Figura 1) [1].

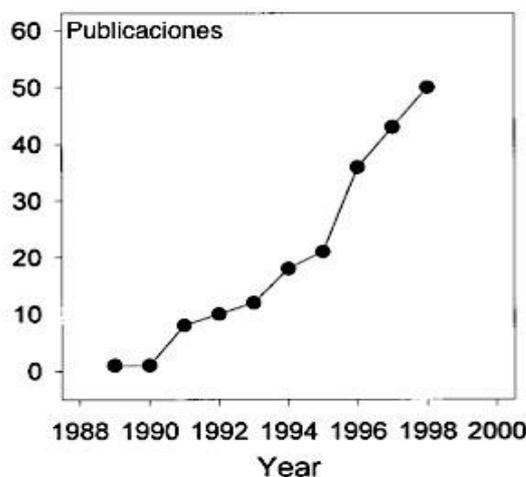


Figura 1. Número de publicaciones listadas sobre Ingeniería de Tejidos desde 1989 hasta 1998. (Imagen obtenida de Bonassar LJ, *Tissue Engineering: The First Decade and Beyond*, 1998 [1]).

Actualmente, nos encontramos inmersos en el desarrollo de una tercera generación de biomateriales cuyo diseño busca la interacción con el tejido de forma específica mediante estímulos a nivel celular y molecular; y que combinan las propiedades de bioactividad, bioabsorción y biodegradación dentro del mismo material (Figura 2).

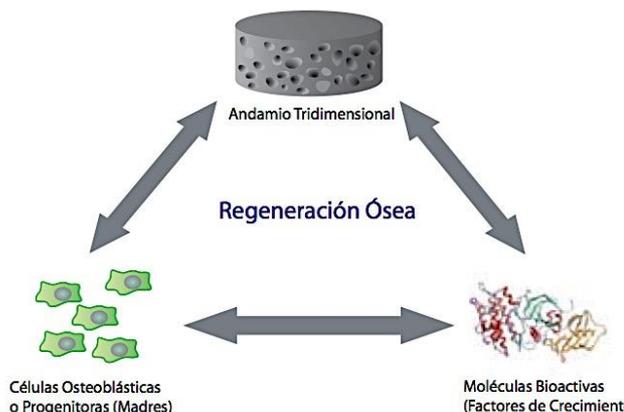


Figura 2. Tríada de la Ingeniería de Tejidos Óseos. Una matriz tridimensional (andamio), unas células progenitoras (células madre u osteoblastos) y un componente molecular bioactivo son necesarios para la creación de implantes osteogénicos eficientes. (Imagen obtenida de Alvarez JF, *Osseous Regeneration through Tissue Engineering: an introduction*, 2009 [2]).

La IT es considerada clave en la medicina personalizada del futuro, de hecho, hay numerosos ensayos clínicos en marcha con prometedores resultados, y es una de las disciplinas que está recibiendo una inversión económica más fuerte, tanto desde el ámbito público como desde el privado. Esta elevada inversión responde al creciente número de personas que se enfrentan a la acuciante necesidad de tejidos u órganos para sustituir aquellos que ya no funcionan o están dañados. Tanto la pérdida total o parcial de tejido, como la pérdida de la función de un órgano, son o pueden ser, extremadamente graves y suponen un importante problema de salud. Estas situaciones que necesitan de una fuente de nuevos tejidos u órganos pueden ser el resultado de un defecto congénito, una enfermedad (ej. cáncer), un suceso traumático (ej. accidente de tráfico) o una necesidad estética (ej. reconstrucción de pecho tras una mastectomía). El uso de órganos para trasplantes, en muchas ocasiones, se ve limitado por la existencia de una demanda que supera con creces al número de donantes. De hecho, a nivel mundial, anualmente un gran número de pacientes muere en listas de espera y muchos otros no llegan ni siquiera a integrarlas. Este problema podría resolverse disponiendo de órganos producidos de forma sintética en el laboratorio mediante ingeniería de tejidos.

Otro factor a tener en cuenta en cuanto a la importancia de la IT en el futuro es el aumento de la esperanza de vida de la población. Actualmente, un 30% de la población tiene más de 60 años con lo cual hay un incremento notable de la incidencia enfermedades como la osteoporosis o la artrosis, que requieren en muchos casos de la utilización de prótesis para recuperar la funcionalidad de la zona afectada y aliviar el dolor. Para responder a estas necesidades, el sector de las prótesis y los biomateriales crece a un ritmo del 6% anual, generando sólo en EEUU más de 100 millones de dólares al año. Sin embargo, es necesaria una gran inversión en I+D+i para desarrollar estos productos, así como estrictos protocolos y controles de seguridad, lo que implica un entorno desfavorable para las empresas en el corto plazo, aunque muy rentable posteriormente.

Hoy en día, los científicos que trabajan en IT intentan fabricar prácticamente cualquier tejido humano, aunque no en todos los casos se ha conseguido. Un ejemplo de éxito es la regeneración de hueso y cartílago, lo que ha permitido incluso generar productos para su uso en clínica ya aprobados por la EMEA (Agencia Médica Europea).

La medicina regenerativa es, por tanto, un campo en continua expansión que se espera sea de uso generalizado en clínica en los próximos años.

1.3. Bases de las técnicas de regeneración del tejido óseo.

El proceso de “bioingeniería” implica frecuentemente la creación de un andamio poroso tridimensional, cuyo diseño y material de origen dependen del objetivo del proyecto. Una vez que se crean los andamios (o scaffolds), se pueden introducir células para iniciar el proceso de formación del tejido. Si el

entorno es adecuado, las células se adhieren, proliferan y se desarrolla el tejido predeterminado. Es frecuente, además, el uso de factores de crecimiento específicos que dirigen las cascadas de señalización para conseguir la formación del tejido de interés. En algunos casos, las células, los andamios y los factores de crecimiento se mezclan de forma simultánea, permitiendo que el tejido se autoensamble (Figura 3). Sin embargo, también es posible utilizar un andamio ya existente, por ejemplo, las células de un órgano donado pueden desprenderse dejando un andamio de colágeno desnudo que puede servir como soporte para el crecimiento de nuevo tejido.

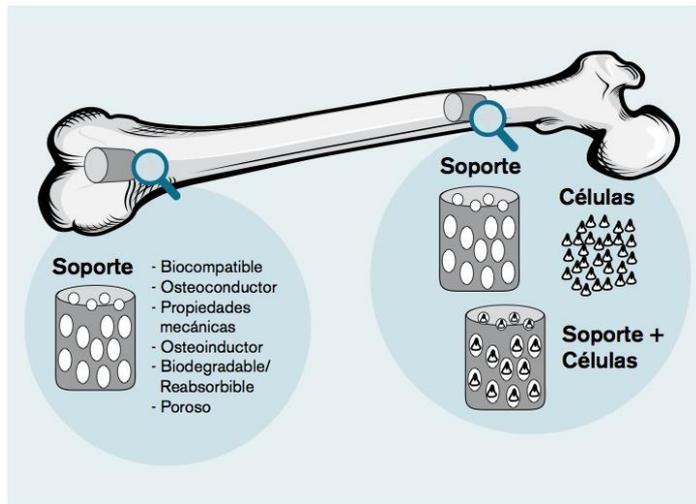


Figura 3. Esquema de las diferentes formas de implante, según incorporen o no células dentro del soporte. (Imagen obtenida de la publicación "Tendencias en Biomateriales" Plataforma de debate, María Vallet [3]).

A fin de evitar un posible rechazo, lo más deseable es utilizar las propias células madre del paciente (autólogas), previamente extraídas y expandidas *in vitro*, para iniciar la colonización del material de soporte (Figura 4).

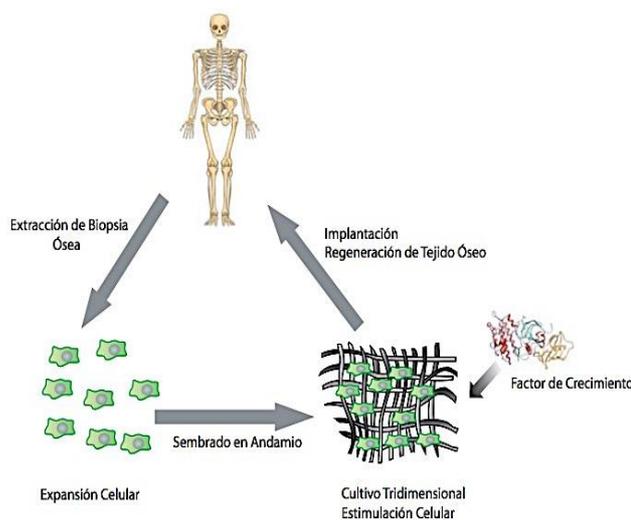


Figura 4. Células son aisladas de una zona sana del paciente y expandidas para ser sembradas en un andamio tridimensional. Posteriormente las células son estimuladas bioquímicamente e implantadas para estimular la regeneración ósea. (Imagen obtenida de Alvarez JF, Osseous Regeneration through Tissue Engineering: an introductio, 2009 [2]).

Estas células madre autólogas pueden extraerse mediante una biopsia mínimamente invasiva, se procesan de manera controlada y segura, y se devuelven al paciente contenidas en el soporte más apropiado. Aún mejor sería poder reclutar o movilizar, una vez implantado el andamio, las células

madre del propio tejido y que éstas colonicen el implante *in situ*. Para ayudar a este proceso, tal y como hemos mencionado anteriormente, se utilizan también factores de crecimiento que promuevan la formación de nuevo tejido óseo.

1.4. Biomateriales. Clasificación, aplicaciones y propiedades.

Un Biomaterial se define como “una sustancia natural o sintética cuya misión es reemplazar una parte o una función de nuestro organismo, de forma segura y fisiológicamente aceptable”. Los biomateriales se pueden clasificar en función de su composición química (metales, polímeros, composites o compuestos, cerámicos o semiconductores), de su origen (naturales o sintéticos), de su uso (temporal o permanente), de su localización (intra o extracorpóreos) o de la función que desempeñan (soporte, diagnóstico o tratamiento). Además, algunos biomateriales contienen fármacos y son considerados medicamentos, y otros portan células vivas y conforman los denominados biomateriales híbridos. Existe además una gran diversidad de aplicaciones finales de estos biomateriales. En la Figura 5 se muestra un esquema general del potencial de esta tecnología, aunque en este trabajo se van a tratar en detalle las técnicas, aplicaciones y potencial de los biomateriales utilizados en la regeneración ósea.

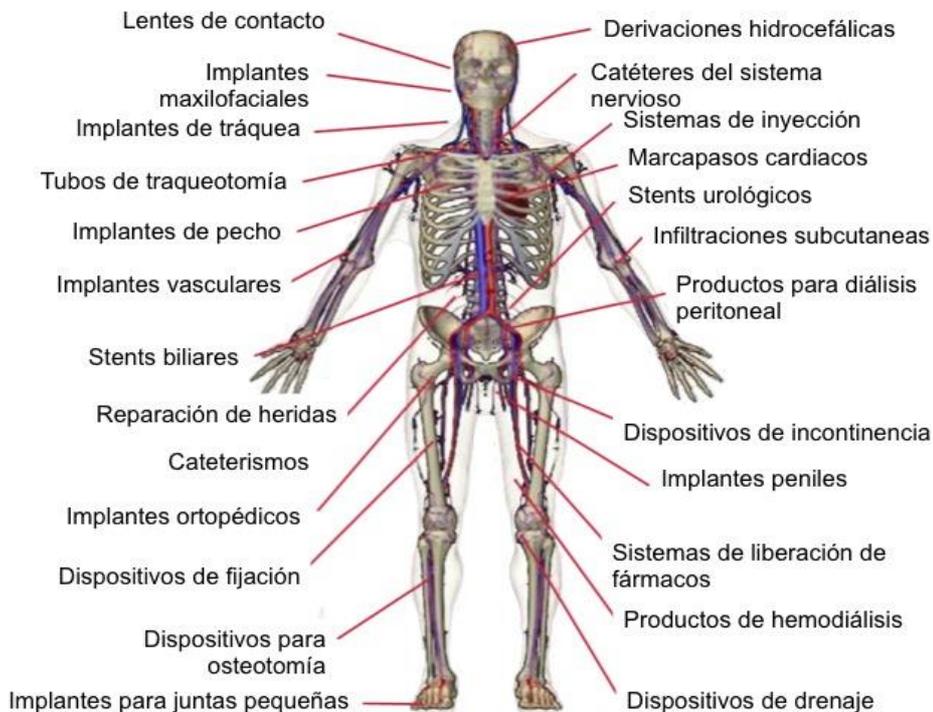


Figura 5. Aplicaciones generales de los biomateriales. Son numerosos los campos de la medicina que pueden beneficiarse de las ventajas clínicas de los biomateriales.

Las propiedades requeridas por un biomaterial que va a ser usado como prótesis para el sistema músculo-esquelético son muy restrictivas. Además de causar el mínimo rechazo posible, hay que tener en cuenta numerosos factores:

- Los fluidos corporales son altamente corrosivos, por lo que el material debe ser resistente a dicha corrosión.
- La prótesis debe tener unas buenas propiedades mecánicas, ya que el sistema músculo-esquelético tiene que soportar fuerzas considerables y variables.
- Las articulaciones están sometidas a fuerzas de contacto permanente, por lo que aquellos biomateriales utilizados para reemplazar articulaciones, deben tener una cierta resistencia al desgaste. Como consecuencia de este desgaste, se pueden acumular materiales de desecho que pueden provocar dolor e inflamación, por lo tanto es preferible evitarlo en la medida de lo posible.
- Es preferible usar materiales ligeros, estables y duraderos en el tiempo y de coste asumible.

Los biomateriales más utilizados en el desarrollo de prótesis y en la regeneración ósea son los biopolímeros y los materiales cerámicos. Los primeros son más fáciles de fabricar y son bastante elásticos, pero tienen menos resistencia mecánica y se degradan con el tiempo; mientras que los compuestos cerámicos han demostrado buena biocompatibilidad y alta resistencia al desgaste, pero sin embargo, tienen menos elasticidad y pueden romperse ante esfuerzos de alto impacto.

1.5. Células madre.

Las dos características definitorias de las células madre son por un lado la **autorreplicación**, es decir la capacidad de generar más células con sus mismas características y propiedades, y por el otro lado la capacidad de **diferenciación**, o de originar células con potencial para producir tipos celulares especializados capaces a su vez de formar tejidos específicos (Figura 6).



Figura 6. Células madre: Autoreplicación y diferenciación. Las células madre tienen la capacidad de generación de múltiples linajes tisulares en función de su origen. En la figura se muestra una MSC (Imagen adaptada de ITRAMED-Traumatología y Medicina Regenerativa - Blog).

Las células madre más utilizadas en IT son las células madre de tejidos adultos (ASCs o Adult Stem Cells), debido principalmente a su potencial regenerador y a que son más seguras que las embrionarias. Las características de estos dos tipos de células se detallan a continuación en la Tabla 1.

Células Madre EMBRIONARIAS	Células Madre de Tejido ADULTO
Pluripotentes	Multipotentes
Alta capacidad proliferativa. Favorecen el crecimiento celular descontrolado y la aparición de tumores	Capacidad proliferativa más reducida. Riesgo bajo de formación de tumores.
Se obtienen destruyendo embriones	Se obtienen de tejidos adultos o del cordón umbilical
Problemas éticos	No hay conflicto ético

Tabla 1. Principales diferencias entre células madre adultas y embrionarias.

Las células madre embrionarias proceden de embriones, son pluripotentes, y por lo tanto son capaces de formar cualquier tipo de tejido del cuerpo humano. El desarrollo embrionario está sujeto a procesos muy controlados y regulados en su conjunto, sin embargo, si estas células se aíslan de ese entorno, pueden sufrir un crecimiento incontrolado que desencadena la formación de tumores y por lo tanto no son seguras para uso clínico a día de hoy. Por otro lado, las células madre adultas, ya han perdido esa pluripotencia y son multipotentes, es decir, solo son capaces de formar tejidos de la capa embrionaria de la que proceden. Además se ha avanzado mucho en los últimos años sobre el control de la diferenciación a diferentes tejidos, por lo que las posibilidades son muchas y las aplicaciones muy seguras.

En general, existen ASCs en prácticamente todos los tejidos del organismo, cuyo fin es reemplazar a aquellas células que se van perdiendo por el propio envejecimiento o por algún tipo de daño tisular. Estas células de tejidos adultos son más numerosas y fáciles de obtener, por ejemplo a partir de la médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical o pulpa dental.

Para la IT es fundamental la investigación básica en biología molecular y celular, ya que para que las técnicas empleadas sean exitosas es necesario conocer en detalle el comportamiento de las células madre, los mecanismos moleculares por los que estas responden a determinados estímulos y el microambiente requerido para su crecimiento y diferenciación según el tipo celular.

2. PROCESOS DE OSIFICACIÓN Y OSTEOGÉNESIS.

2.1. Composición del hueso.

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado, duro y elástico, compuesto por células, minerales, proteínas, agua y otras macromoléculas. El tejido óseo sirve de soporte y protección a los órganos, además de ser responsable del mantenimiento de la homeostasis mineral del cuerpo humano y albergar una fuente de células hematopoyéticas.

Pese a que la proporción de las diversas sustancias que forman el hueso puede variar en función de su localización en las diferentes partes del cuerpo, la edad del individuo o la presencia de alguna enfermedad, entre otras variantes, generalmente se puede establecer que el tejido óseo está formado por dos tercios de sustancias inorgánicas y un tercio de sustancias orgánicas. La parte inorgánica o mineral representa un 60-70% en peso del tejido óseo y contiene además entre un 5-8% de agua mientras que el resto está constituido por la matriz orgánica (constituida a su vez por 90% de colágeno y un 8% de otras proteínas). La matriz orgánica está compuesta principalmente por Colágeno Tipo I y un menor porcentaje de Colágeno Tipo III. Entre las fibras de colágeno se encuentran nanocristales de hidroxapatita, lo que ayuda a mantener la rigidez del hueso [4].

2.2. Proceso de Remodelado óseo.

A lo largo de la vida de una persona, el hueso está expuesto a un deterioro propio de la función de soporte permanente de carga mecánica, pero como órgano vivo, el tejido óseo está sometido a un proceso continuo de remodelado, determinado por regulación hormonal y las necesidades mecánicas del propio hueso de forma que, cada año, se renueva aproximadamente el 10% del esqueleto. La velocidad con la que este proceso se lleva a cabo se conoce como “turnover” o “recambio óseo” (Figura 7).

La unidad de remodelación ósea está formada por un conjunto de células que actúan de forma coordinada (osteoclastos, osteoblastos y osteocitos) y que están encargadas de ir destruyendo pequeñas porciones de hueso (resorción) por hueso de nueva formación. De este modo, la homeostasis del tejido óseo depende del equilibrio entre los procesos de resorción y formación.

Los **osteoblastos** son las células encargadas de la formación de tejido óseo y pueden definirse como células capaces de producir matriz ósea. Este tipo de células produce colágeno de tipo I, osteocalcina y sialoproteína ósea, además de proteínas constitutivas de la matriz extracelular. Los osteoblastos, rodeados inicialmente por osteoide (matriz ósea desmineralizada), se convierten en **osteocitos** al mineralizar la matriz ósea. Estos osteocitos

representan una población de células estables, cuyo fin es el del mantenimiento del hueso como tejido vivo.

Por otra parte, los **osteoclastos** son las células que llevan a cabo la resorción ósea. A diferencia de los osteoblastos, que se originan a partir de las células madre mesenquimales, los osteoclastos se originan a partir de las células madre hematopoyéticas. Estos osteoclastos actúan uniéndose a la superficie del hueso mediante unas proteínas llamadas integrinas. Tras la unión, aíslan la zona del hueso a la cual se han incorporado y bajan el pH local produciendo protones a través del sistema de anhidrasa carbónica lo cual incrementa la solubilidad de los cristales de hidroxapatita, y una vez que la fase mineral se ha eliminado, los componentes orgánicos de la matriz son hidrolizados por medio de la digestión enzimática de ácidos proteolíticos.

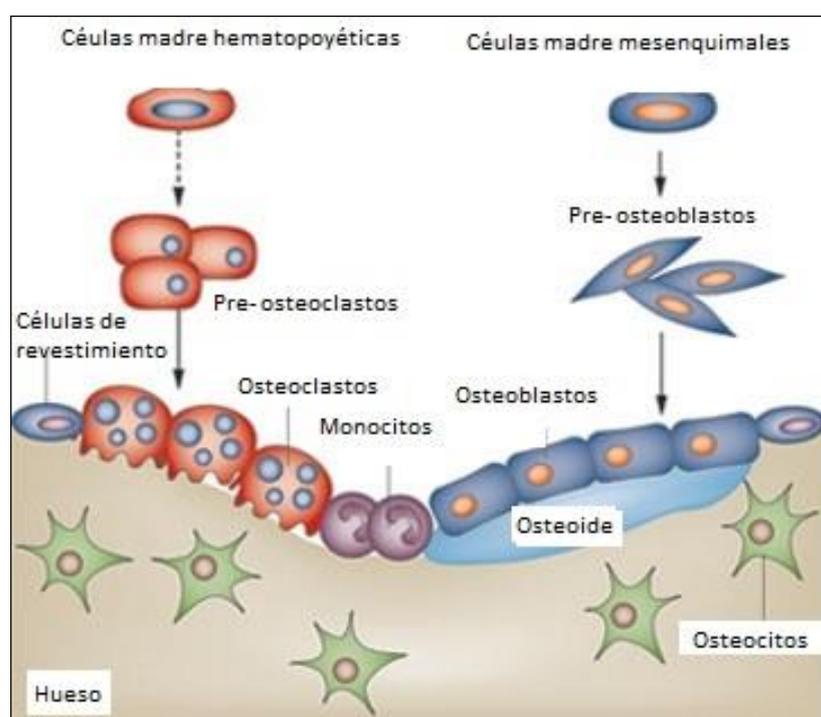


Figura 7. Ciclo de remodelado óseo. (Imagen adaptada de *MicroRNA control of bone formation and homeostasis* [5]).

Cuando el osteocito percibe la necesidad de que una parte del hueso debe ser renovada, envía a la superficie ósea las señales pertinentes que son recibidas por células de la estirpe osteoblástica [6] las cuales responden sintetizando factores quimiotácticos (RANKL y otras sustancias), que activan a los osteoclastos maduros y la osteoclastogénesis, liberando una colagenasa que prepara la superficie ósea para que comience la resorción.

Como resultado de la actividad osteoclástica, la reorganización interna se inicia con la formación de unos grandes espacios cilíndricos alrededor de los vasos sanguíneos. Tras este proceso, se produce la diferenciación de los osteoblastos, que van depositando sobre las paredes del conducto capa tras

capa de tejido óseo laminar, formando paulatinamente lo que se conoce como sistema de Havers, que es la unidad anatómica y funcional del tejido óseo (Figura 8). Así, la reorganización ósea continúa de manera activa durante toda la vida.

Se distinguen dos tipos de tejido óseo (Figura 8):

- **Compacto o cortical.** Carece de cavidades vasculares y su matriz extracelular se organiza en laminillas óseas que pueden ordenarse en forma paralela (hueso compacto laminar) o concéntrica alrededor de un canal (hueso compacto de tipo osteónico). Por dicho canal, llamado canal de Havers, transcurren vasos sanguíneos y nervios que, junto con los osteocitos forman una unidad llamada osteona o sistema de Havers. Los osteocitos se encuentran rodeados de un espacio, donde no hay matriz ósea, denominado laguna. De estas lagunas salen pequeños conductos o canalículos, por donde los osteocitos proyectan prolongaciones celulares a los canales de Havers desde donde obtienen los nutrientes necesarios.

El hueso compacto o cortical forma la capa externa de todos los huesos y gran parte de la diáfisis de los huesos largos.

- **Esponjoso o trabecular,** tiene cavidades vasculares ocupadas por vasos sanguíneos y elementos hematopoyéticos (médula ósea). Normalmente, durante la formación del hueso se forma primero un hueso trabecular no laminar o primario, que posteriormente es sustituido por un hueso secundario que es trabecular laminar.

Este tejido se localiza en los extremos de los huesos largos conformando las epífisis, y en los huesos cortos y planos.

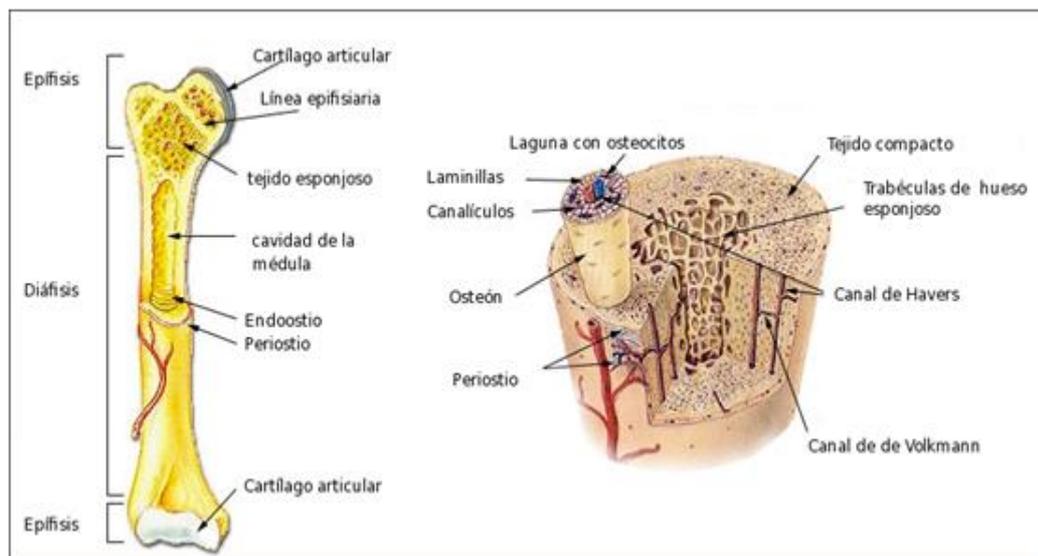


Figura 8. Esquema de la estructura del hueso. (Imagen obtenida de Atlas de histología. Ed panamericana. 3ª edición, 2014).

En cuanto a la osificación, se describen dos tipos, la **osificación intramembranosa** y la osificación **endocondral** (Figura 9).

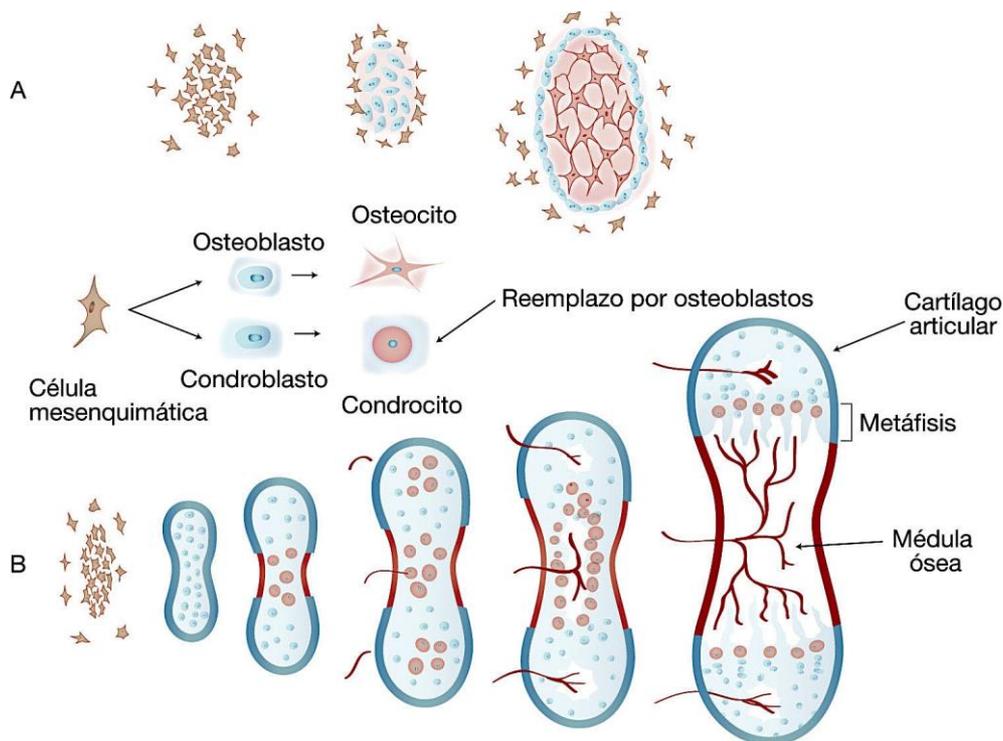


Figura 9. Esquema que representa la osificación intramembranosa (A) y endocondral (B). (Imagen obtenida de H. Alicia Brusco; J. J. López Costa; C. Fabián Loidl. *Histología médica-práctica*).

En la **osificación intramembranosa**, el hueso se forma después de la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos y osteocitos. Este tipo de osificación contribuye al crecimiento de los huesos planos y al crecimiento en espesor de los huesos largos. Además, juega un papel importante en la curación natural de las fracturas óseas.

En la **osificación endocondral**, se forma el hueso largo a partir de un modelo cartilaginoso resultado de la diferenciación de las células mesenquimales en condroblastos. Después de esta diferenciación, el pericondrio de la diáfisis se transforma en periostio, lo cual produce la muerte de los condrocitos de la zona interna dando lugar a la formación de un centro de osificación. En las epífisis, el crecimiento en volumen disminuye la aportación de oxígeno a las células más internas, lo que hace que se formen núcleos de osificación que delimitan el cartílago articular de la metáfisis. En la zona más interna de la misma, se observan las trabéculas entre la región de muerte de los condrocitos, que forman la zona de crecimiento longitudinal, donde se irán depositando los osteoblastos que sustituirán al cartílago y formarán el hueso.

2.3. Células madre mesenquimales (MSCs) y su capacidad osteoformadora.

Para una correcta regeneración ósea es fundamental contar, en la zona a reparar, con un suministro adecuado de células madre mesenquimales o MSCs (de sus siglas en inglés) para iniciar el proceso osteoinductivo.

Las hMSC (human Mesenquimal Stem Cells), también conocidas como células madre del estroma, son un tipo de células madre de tejidos adultos, multipotentes, con morfología fibroblastoide y de origen mesodérmico. Tienen la capacidad para diferenciarse a varios tipos celulares, incluyendo osteocitos, condrocitos y adipocitos, entre otros, tanto *in vivo* como *in vitro* [7] (Figura 10).

Desde principios del siglo XX era conocido que la médula ósea contenía células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimales. Sin embargo, hoy en día se sabe que las MSCs se pueden obtener en cantidad, de forma más accesible y por métodos poco invasivos, a partir de otros tejidos como sangre periférica, tejido graso, médula ósea o pulpa dental, lo cual hace muy atractiva su utilización en medicina regenerativa (Figura 10).

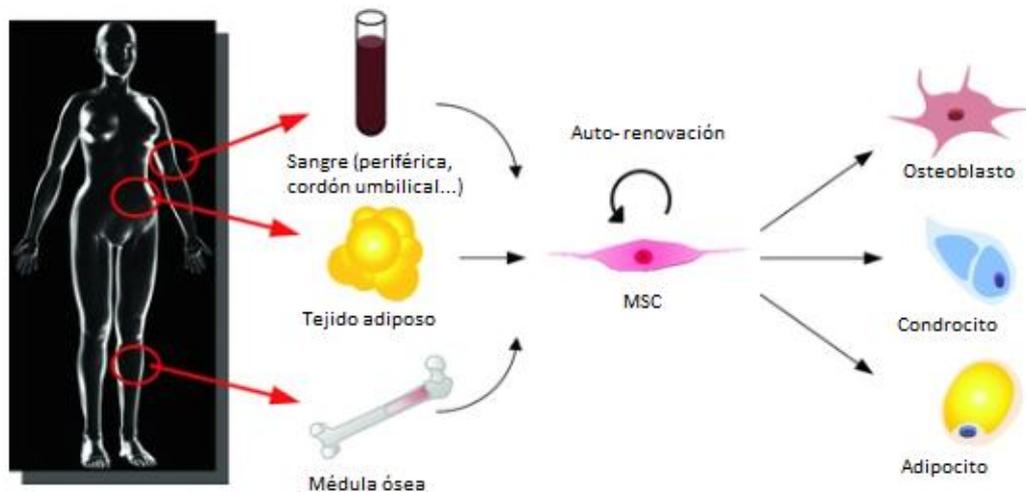


Figura 10. Esquema de la capacidad de diferenciación de las MSCs. (Imagen adaptada de *The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles*).

Otra característica positiva este tipo de células desde el punto de vista de la medicina regenerativa, es que las hMSC tienen un efecto inmunosupresor local debido a su capacidad de secretar citoquinas, especialmente en microambientes inflamatorios, así como una excelente capacidad migratoria hacia estos nichos [8].

El desarrollo de técnicas de medicina regenerativa utilizando MSCs pasa inevitablemente por el aislamiento de este tipo de células a partir de tejidos del paciente y su caracterización, con la finalidad de comprobar, por un lado, la ausencia de contaminación y, por otro lado, que estas células mantienen su multipotencialidad intacta. Por ello, “The Mesenchymal and Tissue Stem Cells Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT)” propuso los siguientes requisitos para definir una población de células como MSC [9]:

- Adherencia al plástico cuando se mantienen en condiciones normales de cultivo.
- Expresión de los antígenos específicos de superficie CD105, CD73 y CD90. Adicionalmente, estas células no deben expresar marcadores de linaje hematopoyético CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA de clase II.
- Capacidad de diferenciación a osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo condiciones estándares de diferenciación *in vitro*.

El tratamiento de lesiones con células madre mesenquimales es una estrategia terapéutica muy atractiva, ya que estas células se pueden expandir y conseguir poblaciones numerosas con capacidad regenerativa que pueden diferenciarse de forma controlada dando lugar a los tejidos requeridos. En los años 70, estas células se estudiaron en más detalle y en las décadas posteriores se determinó que su potencial osteogénico era dependiente de las condiciones ambientales, es decir, que eran necesarios diversos estímulos como el ácido ascórbico, el fosfato inorgánico o la dexametasona para inducir la formación de hueso [10].

El uso de MSCs en IT es un campo en constante desarrollo y existen numerosos proyectos de investigación cuyo objetivo es determinar cuál es la mejor técnica para implantar las células en el paciente, qué proceso tiene mayor efectividad y qué tipo de muestras son las que tienen mayor potencial, según el caso clínico y la lesión a tratar.

Las células madre aisladas de diferentes tejidos pueden usarse directamente en técnicas de IT o dichas células pueden criopreservarse en nitrógeno líquido durante decenas de años hasta que se requieran para uso clínico, ya que en estas condiciones mantienen intactas todas sus propiedades.

2.4. Ventajas del uso de las células madre en la ingeniería del tejido óseo frente a las técnicas clásicas.

Como en cualquier trasplante, en el trasplante de hueso es necesario que el donante y el receptor del tejido sean compatibles. En este contexto, si el donante y el receptor son la misma persona, el trasplante se denomina trasplante autólogo, mientras que, si son diferentes, se denomina trasplante

allogénico. A pesar de que, por lo general, en el trasplante allogénico las hMSC inducen una respuesta inmunológica muy reducida este tipo de trasplante siempre conlleva cierto riesgo de rechazo inmunológico, aunque el trasplante autólogo tampoco está exento de riesgos.

El uso de **autoinjertos óseos** se ha considerado siempre como *gold standard* para la reparación del tejido óseo, pero el acceso limitado a las fuentes de obtención, la prolongación de los procedimientos quirúrgicos y las complicaciones, como la posible contaminación bacteriana, han sido siempre considerados como factores limitantes. Además, en general, los riesgos quirúrgicos tales como infección, sangrado, dolor e inflamación, lesiones nerviosas y/o vasculares también deben tenerse en cuenta. Además, tanto en los trasplantes autólogos como allogénicos se han descrito problemas de supervivencia y distribución celular tras implantes locales de muestras procedentes directamente de biobancos.

Actualmente, la práctica más habitual consiste en el trasplante de hMSCs junto con un material de soporte o scaffold, ya que se ha demostrado que esta combinación funciona mejor en términos de supervivencia y proliferación celular. Además, en este contexto las células mantienen mejor su capacidad de diferenciación y esto aumenta las posibilidades de éxito terapéutico. Asimismo, esta metodología permite combinar el trasplante con tratamientos farmacológicos destinados a ejercer un mayor control de la diferenciación y/o a reducir la respuesta inflamatoria, por ejemplo, modificando la liberación de citoquinas.

2.5. Importancia de procesos de osteoinducción / osteoconducción en la regeneración ósea.

Para poder entender cómo se produce la regeneración ósea a partir de soportes o biomateriales específicos, hay dos procesos que resultan fundamentales. El primero es la **osteoconducción**, que consiste en el crecimiento de células osteoprogenitoras, vasos sanguíneos y tejido perivascular, penetrando en la cavidad o la superficie del material de soporte. El segundo proceso es la estimulación y el reclutamiento de células mesenquimales indiferenciadas hacia el sitio dónde se producirá la regeneración ósea. Allí dichas células se diferencian dando lugar a osteoblastos o células formadoras de hueso. Éste último proceso se conoce como **osteoinducción** [11].

En el contexto de la ingeniería de tejidos óseos, la capacidad **osteoconductiva** de un biomaterial es la capacidad que tiene dicho material de guiar el crecimiento del nuevo tejido. Esta capacidad depende de varios factores que condicionan la afinidad entre la superficie del biomaterial y las proteínas y las células responsables de la formación del nuevo tejido óseo. La superficie del biomaterial tiene que poder acoger a los osteoblastos, y permitir su proliferación. Asimismo, es importante que el biomaterial presente una porosidad macroscópica interconectada con entradas superiores a los

150 μm para permitir la vascularización necesaria al aporte de nutrientes y oxígeno en el interior del injerto.

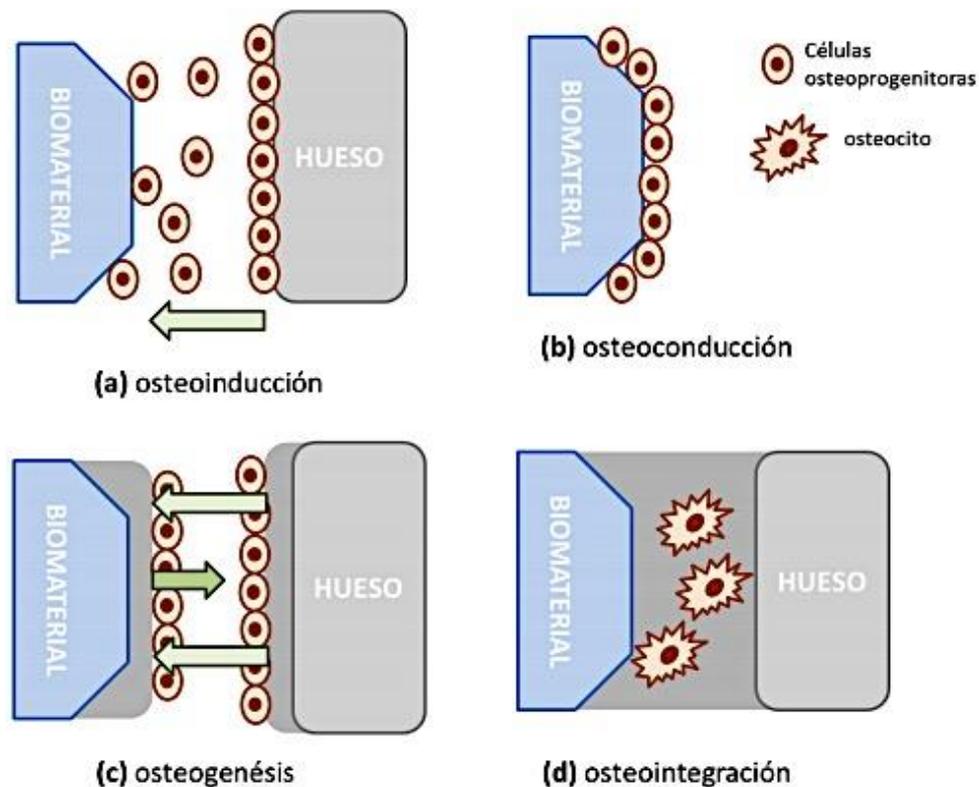


Figura 11. Esquema de los procesos celulares que tienen lugar cuando se implanta un biomaterial en el cuerpo. (Imagen adaptada de Fernández-Moraleda Belén, *Optimización de materiales para regeneración ósea. Estudio de las interacciones de hidroxapatita con proteínas y preparación de andamios porosos. Universidad Complutense de Madrid, 2013*).

Por otro lado, podemos considerar que una sustancia o biomaterial es **osteoinductivo** cuando presenta la facultad de formar tejido óseo ectópicamente, es decir, en un sitio anatómico donde no existe naturalmente. Además de contar con un biomaterial osteoconductor, para un exitoso proceso de regeneración ósea es necesario que tenga lugar un proceso osteoinductivo, donde las células osteoformadoras (hMSCs) propias del tejido o aportadas de forma externa, den lugar a la producción de hueso. Esto último se consigue con la utilización de factores de crecimiento que estimulen la formación del tejido óseo.

Aunque en muchos casos, las células madre que contiene el tejido son capaces de regenerarlo por sí mismas, en otras ocasiones, como en el caso de fracturas traumáticas o ciertas patologías óseas que cursan con pérdida de tejido, es necesaria la implantación de nuevas células con este potencial, que ayuden en la regeneración.

3. PATOLOGÍAS QUE CURSAN CON PÉRDIDA DE MASA ÓSEA.

Además de las fracturas de tamaño crítico, que son aquellas en las que la pérdida de tejido óseo es tan grande que no se resuelve por sí misma, en la práctica médica habitual encontramos también una serie de enfermedades que van acompañadas de una importante pérdida de masa ósea que supone normalmente la necesidad de abordajes quirúrgicos para su reparación. Estos abordajes quirúrgicos llevan implícitos una serie de complicaciones asociadas, así como un elevado gasto sanitario, entre otros inconvenientes. Es por esto, que surge la necesidad de desarrollar la medicina regenerativa para el tratamiento de las mismas de forma más segura y eficaz, disminuyendo los riesgos quirúrgicos y proponiendo una solución con la mejor recuperación funcional posible.

A continuación, enumeramos patologías relacionadas con una alta pérdida de masa ósea localizada en las que puede resultar útil la técnica de reparación usando células madre mesenquimales (hMSCs):

3.1. Osteonecrosis.

La osteonecrosis o necrosis avascular, es una enfermedad que consiste en el deterioro y muerte del hueso debido a una disminución de flujo sanguíneo en la zona (fundamentalmente a nivel de las articulaciones). La incidencia máxima se sitúa entre los 30 y 60 años, representando, además de un problema de salud importante por la clínica y sufrimiento que provoca en el paciente, un serio problema a nivel socio-sanitario ya que supone serias limitaciones funcionales en una edad productiva que pueden llevar a la incapacidad temporal o incluso permanente.

La causa de la osteonecrosis puede ser de origen **no traumático** (idiopática, lupus, VIH, anemia, hemoglobinopatías, pancreatitis, trastornos de coagulación, disbarismo, enfermedad de Gaucher, hipertensión, hábitos de vida poco saludables (consumo excesivo de alcohol, anabolizantes, etc) o provocada por un mecanismo de origen **traumático**. Las articulaciones más frecuentemente afectadas son cadera y hombro, aunque también puede afectar a otras como rodilla, codo, mandíbula, tobillo o muñeca, y puede aparecer sólo una de las articulaciones o en varias a la vez. De entre todas las citadas anteriormente, la etiología que registra una mayor incidencia es la osteonecrosis atraumática de cabeza femoral (ONCF) además de ser la que presenta mayores complicaciones a largo plazo. Este tipo de lesión, normalmente provoca colapso en la cabeza femoral y acaba siendo subsidiaria de artroplastia, con todo lo que esto supone a nivel de complicaciones asociadas a la cirugía, vida media limitada de la prótesis implantada, costes sanitarios, etc.

Los tratamientos son en su mayoría quirúrgicos: injerto óseo, injerto óseo vascularizado, reemplazo total de la articulación, cambio de la alineación del hueso para aliviar el estrés (osteotomía) o extracción de la parte interior del hueso para aliviar la presión y favorecer la vascularización.

Como hemos señalado anteriormente, teniendo en cuenta el perfil de los pacientes y los riesgos y complicaciones que las cirugías suponen, la mejor opción para los pacientes con diagnóstico de osteonecrosis consistiría en decelerar la degeneración ósea a través de tratamientos específicos con MSCs aplicados de forma conjunta a intervenciones habituales en este proceso, como la osteotomía de descarga.

3.2. Tumores óseos.

Un tumor benigno es aquel caracterizado por una proliferación anormal de células propias (con tamaño y características típicas de ese tejido) las cuales no poseen capacidad metastática y cancerosa. Los tumores óseos benignos se pueden encontrar en distintos estadios y su diagnóstico no es fácil, ya que cursan con una clínica muy inespecífica caracterizada por dolor localizado y poco intenso.

Se pueden clasificar en: latentes, si están confinados y no producen sintomatología; activos, cuando hay una ligera expansión y produce dolor; y, por último, agresivos, cuando el diagnóstico por imagen muestra afectación de la estructura del tejido e invasión del tumor a las partes blandas o la articulación. En algunos casos se produce pérdida estructural del tejido afectado y de la zona adyacente y es necesaria la resección del tumor con lo que el tejido óseo en ocasiones debe ser reconstruido para evitar una pérdida de las propiedades mecánicas del hueso. En cuanto a los tumores malignos que afectan al hueso y en los que es necesario la resección del tumor y la reconstrucción ósea para evitar una pérdida funcional, señalamos como entidad principal el osteosarcoma, que constituye el tumor primario óseo sólido más frecuente, con una incidencia que se concentra en la edad juvenil, siendo el 75% de los afectados menores de 25 años. En los pacientes con osteosarcoma, generalmente son usadas terapias quirúrgica y quimioterápica combinadas, siendo la cirugía obligatoria si se pretende un tratamiento curativo. En esta patología, característica por su gran agresividad local, los avances médicos en los últimos 30 años han permitido la preservación de la extremidad en algunos casos ante fracturas patológicas lo que era antes indicación absoluta de amputación [12]. Actualmente las reconstrucciones por medio de endoprótesis o aloinjerto (o combinadas) son las más frecuentes, con complicaciones tales como infecciones, falta de ajuste correcto del material protésico, etc. Además la quimioterapia es un factor limitante para la unión de un aloinjerto al hueso huésped [13] y las restricciones de tamaño pueden muchas veces entorpecer la recuperación funcional ya que en numerosas ocasiones hay que adaptar un hueso adulto para pacientes jóvenes.

Otras lesiones pseudotumorales que podemos encontrar en el tejido óseo son las siguientes: quistes óseos (solitario, aneurismático, yuxtaarticular, epidermoide intraóseo), defectos fibrosos corticales, fibromas no osificantes, granulomas eosinófilos, displasias fibrosas, miositis osificante, tumores pardos del hiperparatiroidismo. En este tipo de lesiones, está

también indicado el abordaje quirúrgico dependiendo de las características individuales del caso y las limitaciones funcionales que produzcan.

3.3. Osteoporosis.

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más frecuente en la actualidad. Se caracteriza por una pérdida de la masa ósea y un deterioro de la microarquitectura del hueso (Figura 12), con afectación generalizada del esqueleto, lo que determina un aumento de la fragilidad ósea y un mayor riesgo de sufrir fracturas. Esta patología, se desarrolla sobre todo en mujeres, especialmente post-menopáusicas debido a la disminución de los niveles de estrógenos. Además, existen otros factores relacionados tales como el déficit de calcio y vitamina D, el consumo de tabaco y alcohol o una baja actividad física, que aumentan el riesgo de sufrir osteoporosis.

Los fenómenos que determinan esta enfermedad suceden como consecuencia de la alteración del funcionamiento de las unidades de remodelación en las personas que sufren osteoporosis y son los siguientes [14]:

- Disminución de las trabéculas y del grosor de la cortical.
- Desaparición de una parte del entramado trabecular.
- Aumento del número de concentradores de tensión en las trabéculas.
- Porosidad cortical.
- Inmadurez del tejido óseo.

Estas alteraciones están reflejadas en la Figura 12:

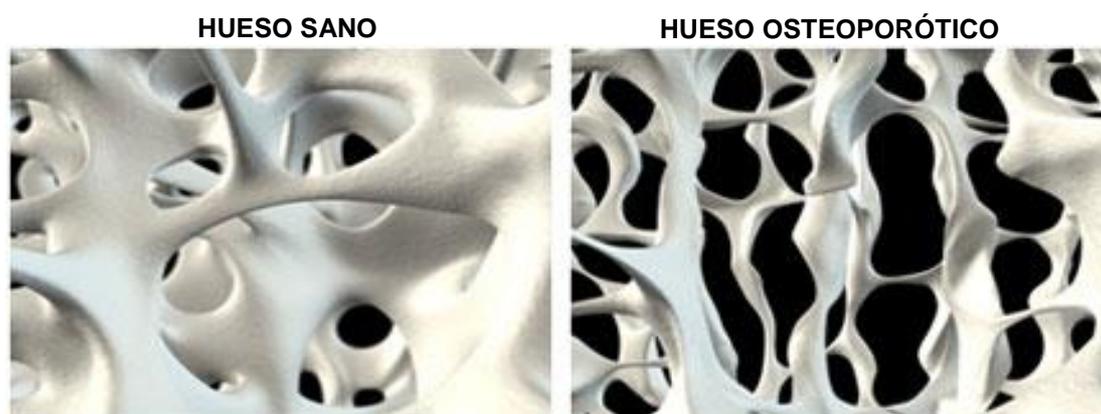


Figura 12. Alteraciones estructurales óseas determinadas por el balance negativo de la unidad de remodelación y el aumento de recambio óseo. (Imagen obtenida del American College of Rheumatology).

Normalmente, la pérdida de masa ósea en sí no produce síntomas, apareciendo éstos en forma de fracturas ante episodios sin factores desencadenantes claros, siendo las más frecuentes y características las de las vértebras dorsales bajas y lumbares. Se estima que más del 50% de mujeres y aproximadamente un 20% de hombres mayores de 50 años, tendrán fracturas por fragilidad a lo largo de su vida.

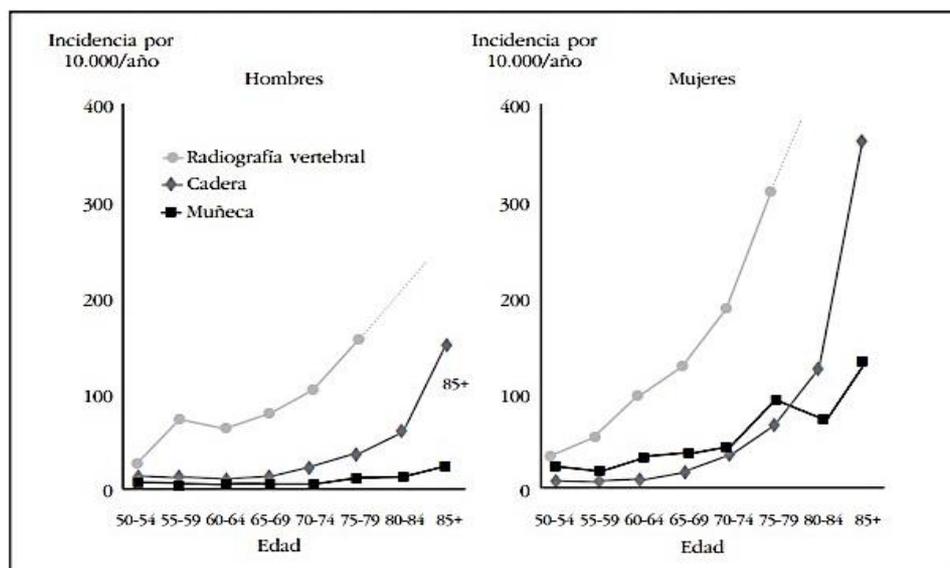


Figura 13. Incidencia de fracturas de cadera, vertebrales radiográficas y de Colles según edad y sexo. (Datos obtenidos del Estudio Prospectivo Europeo sobre Osteoporosis [15]).

El llamado índice FRAX permite estimar el riesgo absoluto de sufrir una fractura osteoporótica a 10 años combinando factores clínicos con pruebas complementarias. Este índice ayuda a establecer si está indicado o no iniciar el tratamiento farmacológico, ya que éste puede tener efectos secundarios asociados:

En el caso de los **bifosfonatos**, fármaco de primera línea en el tratamiento de la osteoporosis, se han descrito como efectos secundarios esofagitis, gastritis, mialgias, dolor óseo, fracturas atípicas de fémur, etc, además de la no muy frecuente (pero grave) aparición de osteonecrosis maxilar.

Entre los fármacos empleados, señalamos también los modificadores selectivos de los receptores estrogénicos o **SERMs**, que aumentan el riesgo de enfermedad tromboembólica además de no estar demostrado que intervengan en la prevención de fracturas de cuello femoral, aunque sí contribuyen a la disminución de la pérdida de masa ósea reduciendo la incidencia de las fracturas vertebrales. Disponemos también del **Denosumab**, anticuerpo monoclonal humano (IgG2) que disminuye la resorción ósea. Se han descrito casos de fracturas atípicas y osteonecrosis de mandíbula, pero con una incidencia baja. Debe evitarse su administración en casos de hipocalcemia[16]. La **PTH (hormona paratiroidea)** ha

demostrado eficacia osteoformadora, pero entre los inconvenientes de su uso destaca el alto precio que restringe su uso a formas graves y ha demostrado una reducción significativa del riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales, pero no de cadera.

En caso de las fracturas secundarias a osteoporosis, el tratamiento requiere cirugía asociada a terapia rehabilitadora, con los consiguientes riesgos relacionados con el tratamiento quirúrgico ya señalados en anteriores secciones. En los últimos años, debido al envejecimiento de la población, se ha dado un incremento considerable en este tipo de fracturas. Además, como dato que refleja el complejo manejo de esta problemática, en España el 45% de los pacientes que han sufrido una fractura vertebral secundaria a osteoporosis quedan con daño funcional y hasta el 50% llegan a desarrollar una incapacidad total o parcial [17].

En conclusión, se debe considerar la osteoporosis como un gran problema de salud pública lo que justifica el aumento de medidas preventivas eficaces, así como la inversión en nuevas líneas terapéuticas ya sea en el contexto de prevención de fracturas como en la mejora en el tratamiento de las mismas. El principal objetivo de estas líneas terapéuticas ha de ser la prevención de la fractura aumentando la masa ósea y optimizando la calidad de hueso, eliminando en lo posible los efectos secundarios ya señalados. En este contexto, el empleo de MSCs podría llegar a convertirse en terapia de primera línea, mejorando la calidad y funcionalidad del hueso sin provocar efectos nocivos sistémicos o locales en el paciente derivados del propio tratamiento. Dada la extensión de la lesión en este caso, el uso combinado de MSCs e hidrogeles parece ser la técnica más adecuada para su abordaje.

4. PRINCIPIOS MOLECULARES DE ACTUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS (BMPs).

4.1. Biología de las BMPs.

Como ya se comentó anteriormente, la ingeniería del tejido óseo intenta, en la actualidad, llevar a cabo la restauración de tejidos dañados mediante el uso combinado de biomateriales y MSCs, que podrían modificarse genéticamente de forma específica para mejorar su capacidad regenerativa. Estas células suelen administrarse junto a factores de crecimiento específicos ya que la capacidad de diferenciación de las MSCs hacia distintos linajes y tejidos depende en gran medida de señales de transducción específicas iniciadas por este tipo de factores.

En 1965 se publicó el primer artículo [18] que describe que la matriz extracelular ósea posee la capacidad de inducir la formación de hueso. El mismo grupo, dirigido por el Dr. Uris, publicó en 1973, el descubrimiento de unas proteínas que podían ser las responsables de ello, a las que llamo Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs). Las BMPs son factores de crecimiento multifuncionales que pertenecen al grupo de los factores de crecimiento transformantes y constituyen una superfamilia de proteínas con capacidad de inducir fuertemente la formación de hueso, cartílago y tejido conectivo. También son importantes durante la embriogénesis, organogénesis, proliferación celular o diferenciación de células madre [19].

Las BMPs han sido aisladas en más de 40 tejidos diferentes. Hasta el momento se conocen casi una veintena de BMPs, algunas de las cuales también se denominan proteínas morfogenéticas derivadas de cartílago (CDMPs) o factores de crecimiento (GDFs). En vertebrados se han descrito más de 15 BMPs, aunque BMP-2 se ha posicionado como el inductor más potente de la formación de hueso *in vivo* [20]. Además, cabe destacar que las proteínas BMP-1 a BMP-8 están presentes en los tejidos óseos humanos y de la mayoría de ellas se han descrito propiedades osteoinductivas. En cuanto a su estructura, estas proteínas son relativamente pequeñas, con un peso molecular en torno a 30 KDal. Están formadas por dos cadenas polipeptídicas idénticas, que tras disociarse producen la proteína biológicamente activa. Las BMPs interactúan con receptores específicos que se encuentran en la superficie celular, conocidos como “bone morphogenetic protein receptors” (BMPRs), lo que provoca una transducción de la señal y desencadena la fosforilación y movilización de unas proteínas citosólicas llamadas Smad (Smad1, Smad5 y Smad8). Éstas forman complejos y se translocan al núcleo donde promueven la transcripción de sus genes diana. Hay 2 tipos de receptores, BmprI y BmprII, asociados a sus diferentes ligandos y cuyo correcto funcionamiento es clave en la actividad osteogénica [21] (Figura 14).

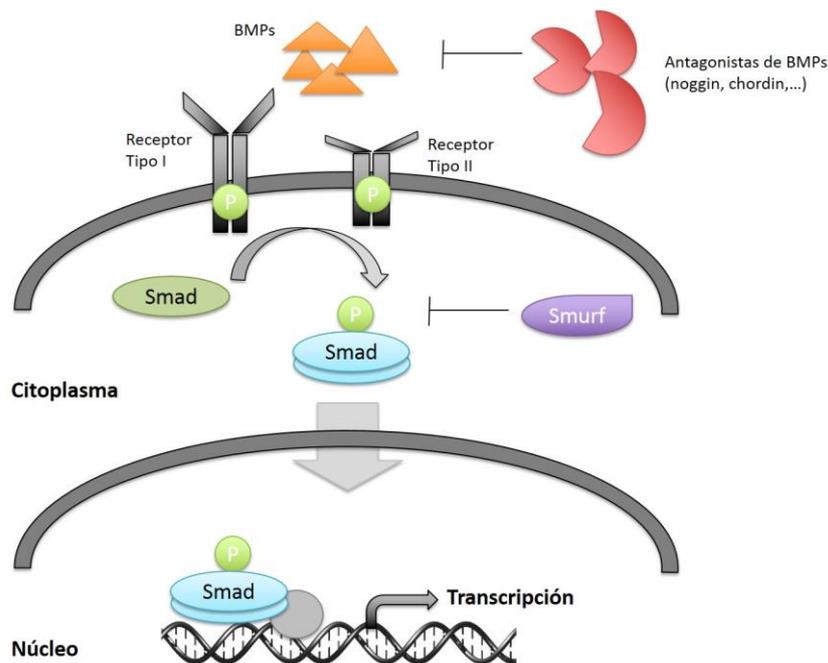


Figura 14. Regulación molecular de los BMPs. Algunos antagonistas extracelulares, como Noggin o Chordin, actúan bloqueando directamente la unión de los BMPs a sus receptores de membrana. También puede ocurrir una regulación de la cascada de señalización a nivel de citoplasma mediada por proteínas como Smurf. (Imagen adaptada de *Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumorigenesis*).

Hay evidencia de una autorregulación transcripcional de la expresión de BMPs en osteoblastos. Este mecanismo actúa como un bucle negativo disminuyendo la exposición celular a los mismos. Sin embargo, la actividad es controlada fundamentalmente por factores intracelulares y extracelulares que modulan la acción de los BMPs y actúan como antagonistas. Algunos de estos antagonistas o reguladores negativos de BMPs con un papel relevante en la regeneración ósea son Smurf1, Smurf2, Noggin o Chordin [22].

Se han descrito diferentes malformaciones y enfermedades óseas o esqueléticas provocadas por mutaciones en BMPs o en alguno de sus reguladores. Así como también, se ha publicado que ratones deficientes en algunos de ellos no son viables [23].

4.2. Uso de factores de crecimiento (BMPs) en Ingeniería del tejido óseo.

Recientes investigaciones en el campo de la IT han permitido diseñar scaffolds con propiedades osteoconductoras capaces de imitar propiedades naturales del tejido óseo. También se ha demostrado que es posible incorporar factores de crecimiento en estas estructuras, ya sea por encapsulación, absorción o atrapamiento, lo que podría ser una importante ventaja en términos de osteoinducción.

En general, a día de hoy, cualquier droga o medicamento puede ser integrado en un scaffold, aunque se está trabajando intensamente en cómo controlar adecuadamente la liberación de estas moléculas bioactivas. En cuanto a factores de crecimiento, ya se ha demostrado el incremento en la osteoinducción tras integrar TGF β (transforming growth factor- β), BMPs (bone morphogenetic proteins), IGFs (insulin-like growth factors), PDGFs (platelet-derived growth factors) o VEGFs (vascular endothelial growth factor) en estas estructuras, promoviendo y facilitando la regeneración ósea [24].

De todos los factores de crecimiento utilizados, los más estudiados son las BMPs, que han mostrado ser potentes factores osteoinductivos al inducir la mitogénesis de las células madre mesenquimales y otros osteoprogenitores y favorecer su diferenciación hacia osteoblastos [25].

El uso de estos factores liberados de forma controlada desde un scaffold sobre el que se asientan células madre, es en el momento actual uno de los métodos más efectivos en cuanto a la regeneración del tejido óseo. Una de las estrategias utilizadas en la actualidad combina proteína humana recombinante (rhBMP-2) con una esponja absorbente de Colágeno I [26], aunque también se han usado hidrogeles u otros materiales en combinación con estos factores [27]. Ahora las investigaciones en el campo de la IT del hueso se centran en hacer el procedimiento de colocación del implante lo menos invasivo posible y de tratar de llevar a cabo una liberación más prolongada de los factores utilizados [28].

Sin embargo, la administración de factores de crecimiento también tiene efectos adversos a nivel local. Los más destacados son la formación ectópica de hueso, la activación de células tumorales, la resorción mediada por osteoclastos o una inapropiada adipogénesis, así como todos aquellos relacionados con la administración de dosis suprafisiológicas, algo necesario dada la baja estabilidad de estos factores tras su administración [29]. Al contrario de lo que se pudiera pensar, las células no ven afectadas en su morfología en respuesta a dosis elevadas de BMPs, pero sí muestran alteraciones en sus propiedades mitogénicas. Por ello, se está trabajando para determinar un uso más apropiado y seguro de BMP2 y otros factores de crecimiento en clínica, tendiendo hacia concentraciones que minimicen los efectos secundarios.

Una posibilidad para disminuir la cantidad necesaria de estos factores para que tenga lugar la formación de hueso es la modulación de la expresión génica de las MSCs para hacerlas más susceptibles a este tipo de señales. Esta es un área que se está investigando actualmente.

5. TIPOS DE SCAFFOLDS, CARACTERÍSTICAS, VENTAJAS E INCONVENIENTES.

Como hemos visto anteriormente, los scaffolds sirven como sustrato para la adhesión celular y proporcionan un soporte mecánico para la regeneración del nuevo tejido. Para que esto sea posible, los biomateriales que configuran estas estructuras deben tener unas características y composición específicas que detallamos en los siguientes apartados.

5.1. Características de los biomateriales.

Es fundamental determinar las características y propiedades requeridas por un biomaterial en función de su uso [11]. Durante su diseño para la Ingeniería de Tejido óseo se deberán tener en cuenta los siguientes puntos [30]:

- *Estructura*

La estructura del material define sus propiedades mecánicas. El diseño debe tener unas propiedades físicas, mecánicas y químicas apropiadas para mantener la funcionalidad, que en muchos casos dependen del lugar de implantación y de las fuerzas mecánicas a las que este expuesto el implante.

- *Forma*

Importante en el caso de los biomateriales sólidos. Está condicionada por su función y aplicación. Incluso es posible construirlo con un detalle micrométrico permitiendo un diseño individual para que cada caso se adapte al tipo/forma de la lesión a reparar.

- *Tamaño del poro*

A mayor porosidad e interconectividad mayor capacidad de proliferación y migración celular y mejor transporte de nutrientes. El tamaño del poro para aplicaciones en hueso se estima que debe estar entre 200 y 900 μm . El material debe tener una estructura porosa interconectada para permitir la difusión de nutrientes a las células que se encuentran en la construcción. La estructura también debe permitir la eliminación de los productos de desecho y de degradación del material sin interferir con el correcto funcionamiento del sistema, así como una correcta vascularización y proliferación y migración de las células.

- *Dimensionalidad*

Los cultivos se pueden diseñar en 2D o en 3D, y esta estructura afecta a la rigidez de la matriz, lo que condiciona la adhesión y la regulación de las señales. Los sistemas 3D se asemejan más al escenario *in vivo*, aunque el diseño final dependerá de su función y aplicación.

- *Superficie*

La capacidad de interacción entre la superficie y las células es fundamental, lo que viene determinado principalmente por la hidrofiliidad y la carga positiva del material calculado a un pH fisiológico (pH 7.4).

- *Material radiolúcido*

Es preferible que el material implantado pueda ser detectado radiográficamente. Así se podrá realizar una comprobación más precisa de la correcta colocación y realizar un seguimiento posterior.

- *Biocompatibilidad y biodegradabilidad*

El implante se debe integrar adecuadamente sin provocar toxicidad ni causar respuesta del sistema inmune.

5.2. Tipos de biomateriales.

Dentro de los biomateriales podemos hacer una clasificación en cuatro grandes grupos: Polímeros, Cerámicas, Composites y Materiales metálicos o aleaciones. En este trabajo solo se van a tratar los tres primeros, ya que son los de mayor importancia actualmente en los sistemas de regeneración ósea.

- **Polímeros**

Se trata de macromoléculas formadas por pequeñas unidades moleculares. Estas cadenas se obtienen por un proceso denominado polimerización en el que se unen entre sí por enlaces de tipo secundario (fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, etc). Esta estructura es muy versátil, lo que les confiere una gran capacidad de adaptación a los tejidos receptores.

Los polímeros pueden ser de origen natural o sintético, y son de los biomateriales más usados en biomedicina y medicina regenerativa.

Entre ellos hay una amplia variedad, desde los rígidos e inertes a otros solubles en agua (colágeno o quitosan) o aquellos que gelifican cuando alcanzan los 37°C (alginato, gelatina o fibrina), llamados hidrogeles, que están empezando a ser muy usados en regeneración ósea [31].

- **Cerámicas**

Los biomateriales cerámicos son comúnmente usados en medicina regenerativa debido a que favorecen significativamente la adhesión celular. Son bastante resistentes al desgaste. En general son duros y frágiles debido a sus enlaces iónicos y covalentes.

Existen tres tipos principales de cerámicas: Cristales cerámicos, Cerámicas de fosfatos de calcio y Composites de cristales y cerámicos. Además, se pueden incorporar factores de inducción para aumentar su bioactividad. Todos ellos pueden usarse en diferentes formas: implantes totales, recubrimientos de metales e implantes cerámicos, scaffolds para hueso e ingeniería de tejidos, rellenos para cementos o scaffolds y como vehículos para la liberación de fármacos.

- Composites

Un material compuesto consiste en dos o más materiales física y/o químicamente distintos, con una distribución adecuada y con una interfase que separa ambos materiales. El composite tiene unas características que cada uno de los materiales por separado no podrían tener y que lo hacen único. Un composite principalmente consta de las siguientes partes: matriz, fibras, partículas e interfase. La matriz es la fase continua y la que otorga las propiedades al material final, mientras que las fibras, las partículas y la interfase, están más relacionadas con las propiedades mecánicas y de soporte.

Existe una amplia variedad de composites, aunque se podrían clasificar en tres grupos: materiales compuestos reforzados con partículas, materiales compuestos reforzados con fibras y materiales compuestos estructurales.

Estos materiales compuestos surgen como consecuencia de las limitaciones de los biomateriales anteriores. En ocasiones no se pueden usar materiales concretos, pero existe la posibilidad de combinarlos, eliminando o reduciendo las desventajas que por separado pudieran presentar.

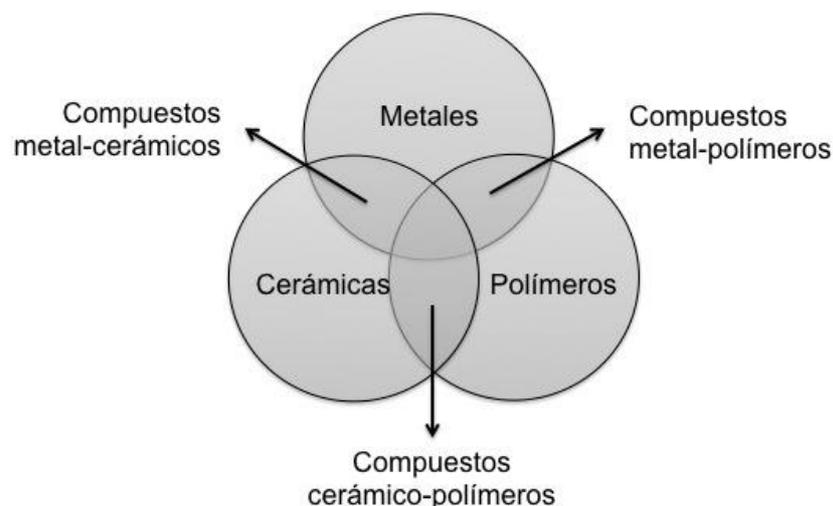


Figura 15. Los composites o compuestos integran otro tipo de materiales en distintas proporciones para conseguir las propiedades deseadas.

Actualmente, para la ingeniería de tejido óseo se están desarrollando

materiales en la línea de una matriz polimérica con refuerzo de componente cerámico. La matriz puede ser natural (como el colágeno) o sintética, pero siempre intentando que se asemeje lo más posible al hueso. En estos casos, se han descrito problemas relacionados con un aumento de la inflamación en la zona del implante, pero esto se compensa al añadir un componente cerámico, que suele ser la hidroxiapatita, y que además influye positivamente en los procesos de diferenciación y proliferación celular. Este tipo de material compuesto tiene además propiedades osteoinductivas [32].

5.3. Scaffolds tipo gel vs scaffolds tradicionales en la regeneración ósea.

Los fosfatos de calcio han demostrado ser buenos biomateriales para implantación de hueso durante los últimos 30 años, y han generado gran interés en el campo de la ortopedia y traumatología debido a su similitud con el componente mineral del tejido óseo. El desarrollo de los mismos comenzó en los años 70, dejando atrás a los metales. Los biomateriales cerámicos más estudiados y utilizados han sido la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y el trifosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) [33]. Sin embargo, están surgiendo nuevos biomateriales más versátiles, como colágeno, gelatina, alginato o el quitosan, incluidos en el grupo de los hidrogeles. Este último ((1-4)-2-amino-2-desoxy- β -D-glucan) se obtiene de la deacetilación de un polisacárido muy abundante en el reino animal, la quitina, el más abundante tras la celulosa, lo que le convierte en un recurso casi inagotable.

Algunos estudios han mostrado que el quitosan aumenta la adhesión y la proliferación celular y posee una mayor capacidad biosintética que otros biomateriales [34], aunque hay que tener en cuenta que puede ser degradado por lisozimas presentes en distintos fluidos biológicos *in vivo* [35]. Posee propiedades reparadoras y hemostáticas, no desencadena respuesta inflamatoria, tiene mucha plasticidad en cuanto a su presentación, flexibilidad y capacidad osteoformadora en el lugar deseado [36].

Los hidrogeles como soportes para la generación o regeneración de tejidos actúan como guía para el desarrollo de los mismos. Los usados en IT presentan poros que permiten el adecuado posicionamiento y proliferación de las células, así como una correcta degradación y capacidad de retención de los compuestos bioactivos. Sin embargo, presentan baja resistencia mecánica. Otra ventaja muy importante de estos hidrogeles es la solidificación a temperaturas de 37°C, por lo que es posible realizar una perfusión de células y factores de crecimiento mediante técnicas no invasivas y que esto gelifique una vez introducido en el lugar adecuado en el paciente.

6. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.

El abordaje más común en la actualidad para el tratamiento de pérdidas de masa ósea son los trasplantes de hueso utilizando tejido autólogo, procedente del propio paciente, o alogénico, en general procedente de bancos de tejido. Sin embargo, este tipo de intervenciones conlleva importantes efectos secundarios no deseados. El uso de sustitutos de hueso basados en la combinación de células madre mesenquimales (MSCs) y una matriz biocompatible que soporte el crecimiento de dichas células y favorezca la regeneración ósea, representa, en estos momentos, la mejor alternativa terapéutica a los implantes alogénicos o autólogos.

Los biomateriales más utilizados hasta la fecha en el desarrollo de prótesis y en la regeneración ósea son los biopolímeros y los materiales cerámicos. Actualmente se están investigando las posibilidades de los polímeros orgánicos termosensibles tipo hidrogel como soporte de crecimiento y diferenciación de las células *in vivo*, en lugar de los soportes sólidos. Este tipo de técnicas que combinan biopolímeros y MSCs evitarían claramente los efectos secundarios del implante. Además, el uso de hidrogeles termosensibles permitiría una fácil manipulación a bajas temperaturas, donde el polímero se encuentra en estado de gel y una solidificación a temperatura corporal tras ser inyectados, de manera que se puede acceder a regiones irregulares o de difícil acceso mediante procesos mínimamente invasivos. Para inducir la diferenciación osteogénica de las MSCs una vez implantadas en el tejido, a día de hoy es necesario incluir factores de crecimiento en el proceso (BMPs), lo cual acarrea también diversas complicaciones derivadas de la necesidad de utilizar dosis suprafisiológicas de los mismos. Debido a este problema, también se está investigando con prometedores resultados, la modificación genética de las células que se incorporan al implante. Por ejemplo, se podría controlar la expresión de los antagonistas de las BMPs, como las proteínas Smurf, alterar la respuesta inmune reduciendo los factores inflamatorios o favorecer la formación de vascularización durante la regeneración promoviendo así la formación de tejido óseo.

Aunque los biomateriales han sido una gran alternativa terapéutica durante la última década y se han llegado a conocer y optimizar los protocolos para conseguir una mayor tasa de éxito, este campo está en constante evolución y actualmente están surgiendo nuevos diseños que mejoran su eficiencia, como puede ser la impresión de tejido en 3D, una técnica que se está empezando a ensayar en modelos animales. Los expertos creen que en pocos años se podrá crear y reemplazar tejido óseo a medida en humanos. Esta evolución constante de la medicina regenerativa está permitiendo aumentar las posibilidades de recuperación de tejido óseo dañado o perdido, y hacerlo mediante procesos menos invasivos, con reducidas tasas de rechazo, menores efectos secundarios y una rápida recuperación de la funcionalidad y de la calidad de vida tras la intervención. Todo esto tiene además una gran repercusión en el gasto público, derivada de un acortamiento tanto de los periodos de recuperación de los pacientes como de los tiempos de hospitalización.

Dado el envejecimiento progresivo de la población y la alta prevalencia de patologías asociadas a pérdida de masa ósea en personas de edad avanzada, el desarrollo de técnicas efectivas de medicina regenerativa del aparato locomotor es de extrema importancia.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Bonassar, L.J. and C.A. Vacanti, *Tissue engineering: the first decade and beyond*. J Cell Biochem Suppl, 1998. **30-31**: p. 297-303.
2. JF, A., *Osseous Regeneration through Tissue Engineering: an introduction*. 2009.
3. Vallet, M., *Tendencias en Biomateriales” Plataforma de debate*. 2012.
4. Walmsley, G.G., et al., *Stem Cells in Bone Regeneration*. Stem Cell Rev, 2016. **12**(5): p. 524-529.
5. Lian, J.B., et al., *MicroRNA control of bone formation and homeostasis*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(4): p. 212-27.
6. Heino, T.J., et al., *Evidence for the role of osteocytes in the initiation of targeted remodeling*. Technol Health Care, 2009. **17**(1): p. 49-56.
7. Rai, B., et al., *Differences between in vitro viability and differentiation and in vivo bone-forming efficacy of human mesenchymal stem cells cultured on PCL-TCP scaffolds*. Biomaterials, 2010. **31**(31): p. 7960-70.
8. Ryan, J.M., et al., *Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection*. J Inflamm (Lond), 2005. **2**: p. 8.
9. Almubarak, S., et al., *Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration*. Bone, 2016. **83**: p. 197-209.
10. Langenbach, F. and J. Handschel, *Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro*. Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(5): p. 117.
11. M Kheirallah, H.A., *Bone Graft Substitutes for Bone Defect Regeneration. A Collective Review*. International Journal of Dentistry and Oral Science (IJDOS), 2016.
12. Scully, S.P., et al., *Pathologic fracture in osteosarcoma : prognostic importance and treatment implications*. J Bone Joint Surg Am, 2002. **84-A**(1): p. 49-57.
13. Hazan, E.J., et al., *The effect of adjuvant chemotherapy on osteoarticular allografts*. Clin Orthop Relat Res, 2001(385): p. 176-81.
14. Olmos Martinez, J.M., J. Martinez Garcia, and J. Gonzalez Macias, *[How should the response to osteoporosis treatment be evaluated?]*. Rev Clin Esp, 2008. **208**(5): p. 247-50.

15. Sambrook, P. and C. Cooper, *Osteoporosis*. Lancet, 2006. **367**(9527): p. 2010-8.
16. Reid, I.R., et al., *Effects of denosumab on bone histomorphometry: the FREEDOM and STAND studies*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(10): p. 2256-65.
17. E, J.G., *Epidemiología de las fracturas osteoporóticas. Mortalidad y morbilidad*. Rev Osteoporos Metab Miner 2010. **2**((supl 4)): p. S5-S9.
18. Urist, M.R., *Bone: formation by autoinduction*. Science, 1965. **150**(3698): p. 893-9.
19. Zhang, J. and L. Li, *BMP signaling and stem cell regulation*. Dev Biol, 2005. **284**(1): p. 1-11.
20. Eyckmans, J., et al., *A clinically relevant model of osteoinduction: a process requiring calcium phosphate and BMP/Wnt signalling*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(6B): p. 1845-56.
21. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors, 2004. **22**(4): p. 233-41.
22. Walsh, D.W., et al., *Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(5): p. 244-56.
23. Gazzero, E. and E. Canalis, *Bone morphogenetic proteins and their antagonists*. Rev Endocr Metab Disord, 2006. **7**(1-2): p. 51-65.
24. Bose Susmita, R.M.a.B.A., *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds*. Cell press, 2012. **30**(10): p. 546-554.
25. Dimitriou, R., et al., *Bone regeneration: current concepts and future directions*. BMC Med, 2011. **9**: p. 66.
26. Triplett, R.G., et al., *Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation*. J Oral Maxillofac Surg, 2009. **67**(9): p. 1947-60.
27. Kempen, D.H., et al., *Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(22): p. 3245-52.
28. Blokhuis, T.J., *Formulations and delivery vehicles for bone morphogenetic proteins: latest advances and future directions*. Injury, 2009. **40 Suppl 3**: p. S8-11.
29. Yousefi, A.M., et al., *Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 6180487.

30. L., E.C.P.A.C.E.L., *Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas* EIA, 2005.
31. Echave, M.C., et al., *Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering*. Curr Pharm Des, 2017.
32. Macuvele, D.L.P., et al., *Advances in ultra high molecular weight polyethylene/hydroxyapatite composites for biomedical applications: A brief review*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **76**: p. 1248-1262.
33. Bohner, M., *Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements*. Injury, 2000. **31 Suppl 4**: p. 37-47.
34. Cui, Y.L., et al., *Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes in vitro*. Biomaterials, 2003. **24**(21): p. 3859-68.
35. Tachaboonyakiat, W., et al., *Novel biodegradable cholesterol-modified polyrotaxane hydrogels for cartilage regeneration*. J Biomater Sci Polym Ed, 2004. **15**(11): p. 1389-404.
36. VandeVord, P.J., et al., *Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice*. J Biomed Mater Res, 2002. **59**(3): p. 585-90.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias en primer lugar a mi directora, la doctora Flor M. Pérez-Campo, por su interés, trabajo y dedicación a este proyecto durante todo el curso.

Gracias a mi familia, apoyo fundamental en todo momento, especialmente a mi hermana Andrea, que siempre supo estar ahí en la distancia y sin la cual no podría haber llegado hasta aquí. A mis padres, por enseñarme que el esfuerzo y el trabajo son necesarios todos los días si uno quiere conseguir sus objetivos y que cuando las cosas no salen bien, hay que levantarse y seguir adelante, no vale rendirse.

Gracias a mis amigos. A Marina, que me ha demostrado que no hay distancia que esté lejos si es tu persona la que está allí. A María, mi noray al que tantas veces he tenido que lanzar la cuerda para anclarme a puerto cuando estaba a la deriva en esta larga travesía.

Y, por último, quisiera dar las gracias a todos los que estuvisteis ahí en el camino y seguís estando, no lo hubiera conseguido sin vosotros.