

Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería tisular

José Becerra, José Antonio Andrades, Jesús A. Santamaría, Manuel Cifuentes^a y Enrique Guerado^b

Departamento de Biología Celular y Genética. ^aDepartamento de Biología Animal. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. ^bServicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Hospital Costa del Sol. Marbella. Málaga.

La acumulación de conocimientos propiciados por la biología celular y molecular, la genética y los avances tecnológicos, en general, está permitiendo entender fenómenos biológicos y hacer propuestas terapéuticas, que hasta hace muy poco tiempo no se podían pensar. Uno de estos campos de avance incesante es el que empieza a denominarse «biología regenerativa». La base de todo este amplísimo cuerpo doctrinal la proporcionan las conquistas que la biología del desarrollo ha realizado en las últimas décadas. El conocimiento de la proliferación en modelos experimentales como la mosca *Drosophila*, el ratón, sin olvidar al nematodo *Caenorhabditis* y el pez cebra, son el pilar básico que hoy nos permite atisbar procedimientos y metodologías que producirán frutos indudables en el control del deterioro físico del hombre, causado por la enfermedad, el traumatismo o el envejecimiento.

El animal lleva a cabo su desarrollo embrionario por una serie de mecanismos que, en gran parte, se pierden al llegar al estado adulto. Esto es, el animal pierde la capacidad de recreación de órganos y tejidos y con ello la posibilidad de regenerar cualquier parte de su cuerpo que pueda ser dañado, amputado o deteriorado. Pero aunque esa capacidad casi siempre se pierde, no ocurre exactamente así en todos los casos. En los vertebrados, por ejemplo, se conserva cierta capacidad regenerativa que va desde la cicatrización general de heridas, a la regeneración estructural y funcional de algunas partes de su cuerpo.

Con todo, la mayoría de los vertebrados conservan una capacidad de regeneración limitada a sólo algunos tejidos y órganos, aunque algunos grupos, desde luego ningún mamífero, mantiene la capacidad regenerativa mucho más ampliamente. Los anfibios urodelos (salamandras y tritones), ni siquiera otros grupos de anfibios, son capaces de restaurar completamente las colas, los miembros, la retina neural e incluso la médula espinal. Por otra parte, los peces teleósteos son capaces de regenerar las aletas si se les amputa parcialmente. En todos estos casos, la regeneración ocurre por un proceso epimórfico que supone la formación de un blastema, o conjunto de células que proliferan y se diferencian para dar lugar a cada uno de los órganos y tejidos que constituyen la estructura amputada, restableciendo la estructura y función¹. En todos estos casos se recapitula parcialmente el desarrollo embrionario a partir de células pluripotenciales, las cuales se consiguen por dos procedimientos: *a)* desdiferenciación de células que retornan la actividad

proliferativa (como ocurre en las regeneraciones de anfibios, peces y órganos como el hígado), o *b)* por células madre (*stem cells*), poblaciones celulares que no siguen el desarrollo embrionario para ser usadas en fases ulteriores del crecimiento o para la regeneración (como ocurre en huesos, epitelios, hematopoyesis y músculo esquelético)². Estos mecanismos están mediados por la presencia de factores bioactivos reguladores de los estados proliferativo y diferenciado.

Reparación ósea

El tejido óseo que forma los huesos está constituido por una eficaz interacción entre tres tipos celulares (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos) y una matriz extracelular altamente organizada. Los osteoblastos sintetizan matriz ósea activamente, y pasan a denominarse osteocitos cuando quedan envueltos por dicha matriz madura. En este estadio disminuyen su actividad sintetizadora y pasan a ejercer el control metabólico de la matriz extendiendo sus prolongaciones y formando una extensa red que la surca. Ambos tipos celulares pertenecen a la estirpe mesenquimática. Los osteoclastos por el contrario, son células multinucleadas de la estirpe monocítica y su función es la destrucción de la matriz del hueso. La biología de las células sintetizadoras y destructoras está finamente regulada por el metabolismo sistémico, de tal forma que constituyen un sistema en equilibrio dinámico en el que la tasa de destrucción se compensa con la de formación, con lo que, en condiciones normales, el hueso está sometido a una continua remodelación. Su homeostasis depende del mantenimiento de dicho equilibrio. La matriz extracelular está formada por una arquitectura ordenada de fibras de colágeno (principalmente de colágeno del tipo I), proteoglucanos y otras proteínas minoritarias (osteonectina, osteocalcina, sialoproteínas, etc.). Esta matriz en estado maduro se mineraliza formándose cristales de fosfato cálcico en forma de hidroxiapatita.

Cuando el tejido óseo sufre una fractura, se pone en marcha un proceso de reparación que conduce a la reposición de la estructura y función perdidas. La reparación de fracturas es más que un proceso de cicatrización cualquiera, en la que el tejido repuesto posee una pobre organización. La reparación ósea es un auténtico proceso regenerativo que en casi todo se parece al de regeneración de los miembros de anfibios. En ella, una serie compleja de factores endógenos y exógenos, que incluyen productos de genes homeóticos³, factores de transcripción⁴, citocinas y factores de crecimiento^{5,6}, conduce a la formación de un blastema de reparación por activación de las células madre. Estas formarán un callo en la zona de la fractura que, tras sufrir un proceso semejante al desarrollo embrionario, dejarán la estructura reparada en forma y tamaño⁷. El proceso tal como hoy lo conocemos es pues una serie de acontecimientos celulares y moleculares perfectamente coordinados.

Correspondencia: Prof. J. Becerra.

Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de Ciencias. Campus de Teatinos. Universidad de Málaga. 29071 Málaga. Correo electrónico: becerra@uma.es

Recibido el 28-8-2000; aceptado para su publicación el 15-11-2000

Med Clin (Barc) 2001; 116: 23-34

Pero, desgraciadamente, hay situaciones anómalas que pueden desviar el proceso normal de regeneración ósea. En determinadas circunstancias, se produce un notable retraso por fracaso de la respuesta perióstica antes de terminar el proceso (retraso de consolidación) o bien la formación del callo no tiene lugar (no unión o seudoartrosis)⁸. Resecciones óseas amplias o enfermedades genéticas como la osteogénesis imperfecta, causada por una mutación puntual del gen que codifica para el colágeno I⁹, interfieren en la biología normal del hueso como tejido. Las soluciones que se adoptan actualmente sólo tienen carácter paliativo.

Todos estos problemas que suponen deficiencias de osteogénesis, salvo los de origen genético, se resumen, en definitiva, en una falta de células o de algún factor bioactivo que regule alguno de los pasos que suponen el discurrir por el linaje osteoblástico. De todas las posibles alteraciones contenidas en esas dos causas generales, hoy sólo sabemos con certeza, que el número de células madre del linaje osteogénico disminuye con la edad de forma muy significativa¹⁰.

Teniendo en cuenta las tres causas esbozadas, falta de células, deficiencias de factores inductores e incapacidad genética, puede adivinarse que los caminos a seguir para la mejora de las diferentes situaciones patológicas pueden ser: a) ante la escasez de células madre, se pueden seleccionar las existentes, amplificarlas *in vitro* y reinyectarlas en los lugares en los que se las necesita¹¹; b) ante la deficiencia de factores, las propias células madre cultivadas y amplificadas *in vitro*, podrían ser inducidas *ex vivo* para posteriormente introducirlas, con su programa osteogénico corregido, en los lugares y pacientes que precisan la reposición de su facultad osteogénica perdida^{12,13}; también puede actuarse, identificados los factores, haciendo llegar los mismos a los lugares donde las propias células del huésped podrían ser inducidas¹⁴, y c) las deficiencias genéticas podrán ser tratadas transfectando las células osteoprogenitoras *in vivo* o *ex vivo* con vectores que pueden ser diseñados para que transporten el gen normal de la deficiencia¹⁵.

En la acumulación de conocimientos en los aspectos reseñados parecen residir las claves futuras para un mejor entendimiento de las distintas enfermedades óseas¹⁶.

Células madre mesenquimatosas

La formación de un blastema de reparación supone el reclutamiento *in situ* de células capaces de proliferar y diferenciarse en el camino adecuado. Hoy sabemos que durante el desarrollo embrionario, células de origen mesodérmico que dan lugar a los distintos tejidos mesenquimatosos, quedan como tales durante el período posnatal, siendo las responsables de la reparación de dichos tejidos durante toda la vida del individuo. A dichas células se les conoce como células madre mesenquimatosas (MSC, *mesenchymal stem cells*)^{17,18}. Aunque se cree que estas células pueden encontrarse como pobladoras habituales de diferentes tejidos mesenquimatosos, el periostio y la médula ósea son los lugares más frecuentemente citados en la bibliografía, a la vez que los más accesibles¹¹. El aislamiento de MSC a partir de la médula ósea, lugar donde también se encuentran las células madre de la línea sanguínea, ha dado lugar a la distinción dentro de la médula entre el tejido hematopoyético y el no hematopoyético, este último ubicado en el llamado estroma. La independencia entre ambos tejidos y, por tanto, entre los procesos hemo y no hemopoyéticos, se ha sugerido y comprobado ampliamente durante la última década^{19,20}. Con frecuencia se usa el término mesengénesis, para expresar el proceso por el cual se diferencian los distintos tejidos mesenquimatosos a partir de las MSC. Así, durante el estado adulto, los vertebrados conservarían la capacidad de reparar sus huesos, cartílagos, tendones, músculos, el propio estroma medular, el tejido adiposo y cualesquier otros tejidos conectivos²¹ (fig. 1). La información que hoy tenemos sobre la progresión de las MSC, a través del linaje osteoblástico, es significativamente mayor que la que poseemos sobre los demás caminos del proceso mesengénico, pero se cree que diferentes factores bioactivos y microambientales

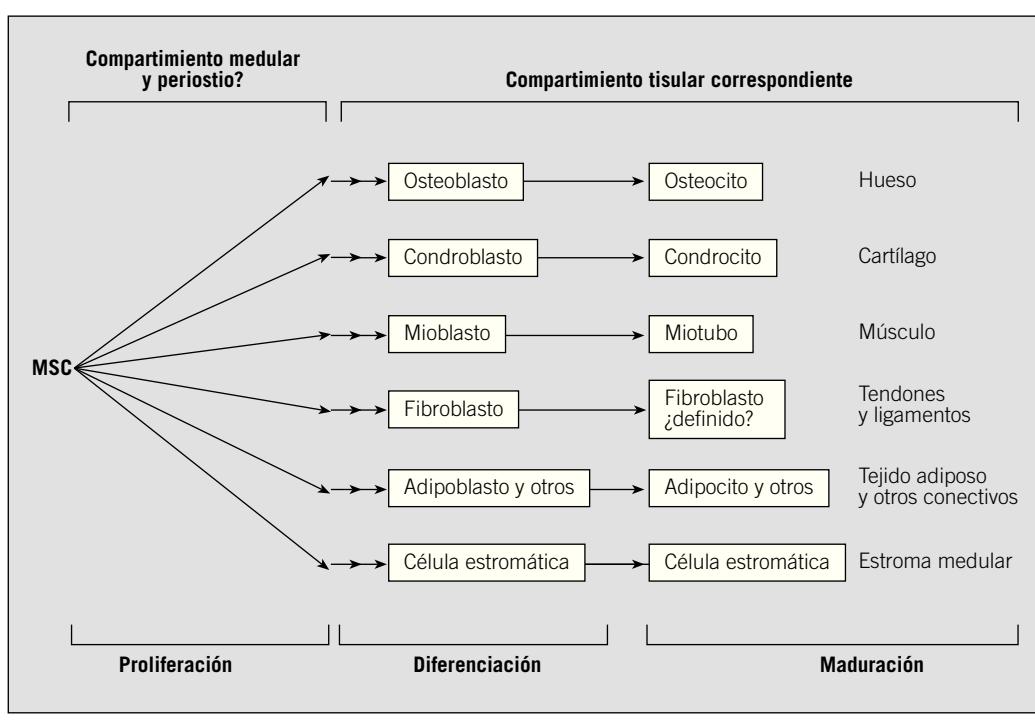


Fig. 1. Mesengénesis. Proceso por el que se originan los distintos linajes de células mesenquimatosas por proliferación y diferenciación de una célula madre mesenquimato (MSC) residente habitual de médula ósea, periostio y algún otro lugar no bien determinado. (Adaptado de Caplan y Bruder¹⁶.)

tisulares, posibilitarían la diferenciación de MSC en cualquiera de los demás tipos celulares mesenquimatosos¹¹. Las dudas que se mantenían sobre si realmente las MSC son pobladores habituales de la médula ósea, como lo son las hematopoyéticas, o contaminación de células osteoblásticas o sus precursoras procedentes de las espículas óseas vecinas, han sido disipadas con una serie de interesantes experimentos en los que MSC de un ratón transgénico que expresa un gen mutado para el colágeno I, se reinyectan en ratones isogénicos irradiados para destruir su médula. Con este procedimiento experimental se puede seguir el camino seguido por las células marcadas o su progenie²². Entre 1 y 5 meses después de la inyección, las MSC con el marcador genético aparecen, en primer lugar, repoblando una gran parte de la médula ósea, para posteriormente servir como fuente continua de células progenitoras de los distintos tejidos mesenquimatosos. Estos estudios no aclaran si las MSC adquieren el fenotipo de cada tejido antes de salir de la médula o después de llegar a cada microambiente tisular. Asimismo, tampoco indican que las MSC sean las únicas fuentes de células progenitoras de los tejidos mesenquimatosos, pero sí que contribuyen de forma importante.

Éstas y otras posibilidades experimentales, como el aislamiento y cultivo *in vitro* de las MSC han abierto muchas posibilidades, en primer lugar para estudiar los mecanismos celulares y moleculares básicos de la mesengénesis, y en segundo lugar, para desarrollar toda una tecnología que permita el uso clínico de estas células en humanos^{11,22-24}.

Factores de crecimiento y osteogénesis

Los factores de crecimiento (GF, *growth factors*) son moléculas polipeptídicas que producen las células y que se incluyen dentro de un gran grupo, cuya misión general es transmitir señales entre unas células y otras para modular su actividad. Aunque el término «factores de crecimiento» no es absolutamente apropiado, puesto que no todos afectan al crecimiento celular, está universalmente aceptado el término para referirse a aquellas moléculas que estimulan o inhiben la división celular, su diferenciación, la migración y expresión génica en sentido general. Otras moléculas que forman grupos separados, aunque afectan a las mismas funciones, son las hormonas polipeptídicas y las citocinas. Las primeras son aquellas sustancias que se producen en glándulas endocrinas, se transportan por la circulación sanguínea y ejercen su acción a cierta distancia. El término citocina, aunque formalmente se refiere a cualquier sustancia que estimula el crecimiento y la división celular, en la práctica se reserva para este tipo de sustancias que están implicadas en la biología del sistema inmune^{25,26}.

Los diferentes tipos de GF realizan su misión a determinadas concentraciones y mediando receptores específicos en las células diana. Pueden actuar de manera autocrina, paracrina, endocrina, yuxtacrina, intracrina o mediada por componentes de la matriz extracelular (fig. 2). Su estructura molecular es variable y pueden tener entre 50 y 150 aminoácidos y ser mono o diméricos, con puentes disulfuro que estabilizan la molécula. Las principales familias de GF se agrupan bajo los nombres TGF-β (*transforming growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), NGF (*nerve growth factor*), PDGF (*platelet derived growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*) e IGF (*insulin-like growth factor*).

Estas familias de GF constituyen un extenso número de tipos y subtipos que se ve cada día aumentado por la descripción de algún nuevo componente. De todos ellos, hasta la fecha, varios han sido implicados en la reparación ósea, aunque no todos con la misma intensidad e importancia. A

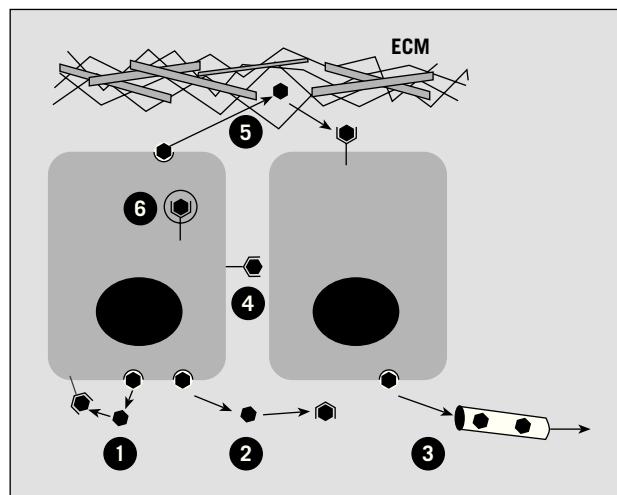


Fig. 2. Vías por las que los GF desarrollan su actividad. Los GF producidos por las células pueden actuar en el interior de las mismas, en su vecindad, o en lugares más alejados, interactuando con receptores específicos. 1, autocrina; 2, paracrina; 3, endocrina; 4, yuxtacrina; 5, mediada por la matriz extracelular (ECM); 6, intracrina. (Adaptada de Nimni²⁶.)

IGF, PDGF, FGF y TGF-β les ha sido reconocida alguna acción en este proceso. A todos ellos hay que añadir un grupo de agentes bioactivos con personalidad propia. Las BMP (*bone morphogenetic proteins*), aunque genéticamente pertenecen a la familia de los TGF-β, tienen una capacidad osteoinductiva que ha sido ampliamente documentada²⁷.

La familia de los IGF contiene al menos dos polipéptidos relacionados que se denominan I y II. De ellos el IGF-I ha sido ampliamente relacionado con la biología del tejido óseo, relacionándose el descenso de la densidad mineral ósea que ocurre con la edad y ciertas afecciones, con un descenso en la concentración de IGF-I circulante, existiendo datos experimentales suficientes que demuestran que la administración de IGF-I incrementa la densidad ósea disminuida²⁸. La hipótesis más apoyada es la que lo implica como mediador en la acción de la hormona del crecimiento sobre el esqueleto, bien mediante una acción endocrina, o bien de forma paracrina o autocrina²⁹.

El PDGF se produce en las plaquetas y posee acción mitogénica sobre células mesenquimatosas^{30,31}. La interacción con su receptor provoca la activación del dominio tirosinacina cinasa del mismo, produciendo su autofosforilización³². Varios trabajos han relacionado en la última década el PDGF con la osteogénesis y la cicatrización de heridas²⁶. La osteoinducción que se produce con implantes de DBM (matriz ósea desmineralizada, *deminerilized bone matrix*) o hidroxiapatita, se incrementa notablemente cuando se absorbe en los mismos PDGF³³. Un cierto efecto sinérgico se ha observado con el TGF-β, el EGF y el IGF-I, lo que está estimulando su uso clínico, sobre todo en cicatrización de heridas²⁶.

El FGF es el nombre genérico de una familia de proteínas, de al menos once miembros, estructuralmente relacionadas. Todas tienen un reconocido efecto mitogénico y angiogénico en células derivadas del mesodermo y neuroectodermo³⁴. De todos los homólogos, el FGF básico (bFGF) es al que se le han descrito más implicaciones en cicatrización de heridas y reparación de hueso. Está implicado en mitogénesis, quimiotaxis, diferenciación y angiogénesis; desarrollo de los sistemas vascular, nervioso y esquelético, y ejerce un papel fundamental en el mantenimiento y reparación de muchos tejidos³⁵.

Las implicaciones del FGF, sobre todo el básico, en cicatrización/reparación ósea, están ampliamente documentadas. La influencia del bFGF tanto endógeno como exógeno, en la aceleración de reparación de fracturas, en el incremento del callo formado, del contenido mineral y de la resistencia mecánica, está bien demostrada³⁶. No obstante, existe cierta controversia respecto a la estimulación o inhibición de las fases finales de la diferenciación del linaje osteoblástico. La dosis, duración del tratamiento, o el transportador utilizado son de importancia capital a la hora de evaluar su posible eficacia clínica³⁷. La vida media relativamente corta de los GF hace especialmente crítico el uso de sistemas de transporte que ralenticen su liberación en el lugar de actuación y que preserven la actividad del factor. En el caso del FGF, y aprovechando su capacidad de unión específica a heparina, se han ensayado múltiples formas de vehiculización del factor. De todos ellos, ha resultado especialmente interesante la unión a ácido hialurónico³⁸. El hialuronato sódico unido al bFGF presenta un efecto sinérgico en la aceleración de las reparaciones óseas³⁶.

Los TGF-β son un grupo de moléculas ubicuas que participan en la regulación de variadas funciones celulares. Incluye, además de las BMP, las activinas y 5 isoformas identificadas de TGF-β, de las que a la β1 y β3 se les conoce como importantes reguladores de la actividad tisular en mamíferos. Los TGF-β, que tienen una estructura dímera estabilizada por puentes disulfuro, se segregan en forma inactiva, precisando proteólisis extracelular para hacerse activos. Se conocen proteínas de la matriz que se unen a la forma latente del factor controlando su activación y, por tanto, su biodisponibilidad³⁹. La omnipresencia de los TGF-β en la regulación del desarrollo y regeneración, es un hecho tan comprobado como mal comprendido. Sólo en reparación ósea, podemos encontrar datos que indican que estos factores estimulan ciertas fases del proceso, como que inhiben ciertas otras. A pesar del desconocimiento que todavía existe sobre el complejo y multirregulado proceso de la formación y reparación del hueso, lo que no cabe duda es que los TGF-β son moléculas centrales en todo este entramado molecular⁴⁰. De todos los datos presentes en la bibliografía, quizás emergen dos hechos claramente contrastados: los TGF-β estimulan la proliferación y reclutamiento de precursores osteoblásticos en los lugares de reparación y, por el contrario, parecen ser menos necesarios, o incluso inhibir, los últimos pasos del proceso. Tampoco se descarta su participación en la «conversación» osteoblastos-osteoclastos, hito central del equilibrio dinámico del hueso⁴¹. Otro hecho interesante aportado recientemente es la posibilidad de un cierto sinergismo entre TGF-β y BMP; los primeros serían ciertamente necesarios, sobre todo como mitogénicos y puede que también como inductores de células madre mesenquimatosas, mientras que en las últimas etapas de la osteogénesis necesitarían el concurso de BMP, razón por la cual, en experimentos *in vitro*, la presencia exclusiva de TGF-β podría tener un efecto inhibitorio, al no ocurrir ese sinergismo natural detectado^{13,42}.

El uso terapéutico del TGF-β es más un deseo que una realidad. Las inyecciones subperiósticas de este factor o su aplicación directa en fracturas han dado como resultado, a veces, incrementos en la formación del hueso y mejoría en la estabilidad mecánica. La difícil evaluación de resultados, da lugar a una gran variabilidad, atendiendo al modelo de fractura usado, a la isoforma del factor, a la concentración, al material usado como soporte o transportador y a la «ventana analítica» utilizada para evaluar y comparar resultados⁴³. Todo ello determina la necesidad de más investigaciones que clarifiquen la acción de los TGF-β en la osteogénesis, antes de poder extender su uso terapéutico.

Proteínas morfogenéticas de hueso (BMP)

El trabajo de Urist⁴⁴ en 1965 debe ser considerado como el que inició lo que hoy es un mundo complejo de proteínas que regulan los más variados procesos morfogenéticos en animales. La capacidad osteogénica que Urist encontró ligada a la matriz ósea desmineralizada, dio lugar a que se postulara, que en la matriz orgánica del hueso deberían encontrarse factores, seguramente proteicos, capaces de inducir en las células vecinas su encauzamiento hacia el linaje osteogénico. Nacieron así, antes de conocerse, las BMP. Nació entonces lo que hoy es una super familia de productos génicos con capacidad de regulación pleiotrópica, es decir, que tienen acción en múltiples funciones: quimiotaxis, mitosis, diferenciación, apoptosis, etc.⁴⁵. Por técnicas moleculares se han identificado y clonado diversos componentes de la familia, que incluye en mamíferos, desde el BMP-2 al BMP-16²⁷, cuyas acciones biológicas van más allá de la morfogénesis ósea: desarrollo del corazón, riñón, mantenimiento de tejidos adultos, inducción mesodérmica, gastrulación, etc. El mecanismo de acción general de las BMP se ejerce a través de los receptores de membrana (BMPR-I y II) que, a su vez, son cinasas que fosforilan a diferentes miembros de la familia *Smads*, señaladores citoplasmáticos que finalmente inducen en el núcleo de la célula la activación de la maquinaria transcripcional⁴⁵.

La presencia de BMP en la reparación de fracturas es un hecho bien documentado⁴⁶. BMP-2, BMP-4 y BMP-7 se expresan tanto en la osificación intramembranosa como endocondral, con diferente intensidad espacio-temporal, demostrado sobre todo por medio de anticuerpos monoclonales e hibridación *in situ*⁴⁷⁻⁴⁹. La presencia de BMP en la reparación ósea y su capacidad osteoinductiva probada también por varios procedimientos experimentales, indica que varios BMP ejercen papeles diferenciados en procesos cruciales de la reparación de fracturas. Las pruebas realizadas en animales han demostrado, por ejemplo, que la inyección de BMP-2 recombinante humano (rhBMP-2) en fracturas de fémur de rata, acelera el proceso de reparación, sin alterar significativamente la secuencia de acontecimientos⁷. La misma proteína, utilizada con colágeno como soporte y transportador en osteotomías de cúbito de conejo, resultó en una aceleración de la reparación frente a los controles⁵⁰. Resultados similares se han obtenido con BMP-7 en diferentes modelos experimentales^{51,52}.

Estos resultados experimentales han disparado la puesta en marcha de experimentos clínicos en humanos, aunque hasta la fecha no se ha publicado ningún resultado que indique una mejoría clara en el proceso normal de reparación de fracturas, siendo los casos en experimentación referidos a fracturas que no unen o que sufren un retraso significativo en su cicatrización. En cualquier caso, los resultados hasta ahora sólo son preliminares^{53,54}.

Materiales osteoconductores

Clásicamente, se viene utilizando el autoinyerto de hueso como la mejor manera de reparar un defecto óseo. El tejido óseo colocado en un entorno óseo vivo, bien vascularizado y en circunstancias biomecánicas favorables, es rápidamente colonizado por células de éste, resultando en la incorporación del hueso transplantado al tejido del huésped con total integración biológica. El injerto actúa como osteoinductor, o sea como inductor de osificación en las células del tejido vivo circundante, y también como osteoconductor, es decir como soporte para que las células del huésped produzcan hueso biológicamente activo. Debe entenderse que de la os-

teoinducción son responsables los factores (difusibles o no) de la matriz que influyen en las células vecinas, mientras que de la osteoconducción son responsables los componentes estructurales (colagénicos y/o minerales) del hueso. La calidad osteoconductora de la matriz ósea se ha tratado de mimetizar con sustancias biológicas o artificiales, que han dado lugar a la fabricación de materiales con la textura y la porosidad del hueso. Cerámica coralina, hidroxiapatita coralina o sintética, combinaciones de hidroxiapatita y colágeno, metales porosos y diferentes polímeros biodegradables, son materiales osteoconductores muy usados en la actualidad^{26,55}.

La cerámica coralina y el colágeno I, con variaciones y adiciones diversas, son los más usados. La cerámica coralina se obtiene a partir del exoesqueleto de corales marinos, y su composición y agregación física son muy similares a la fase mineral del hueso⁵⁶. La utilización en experimentación de estos compuestos y otros artificiales de estructura similar, formados por fosfato tricálcico, ha sido extensa en las dos últimas décadas. En todos los casos, se consigue una buena integración, con penetración de células osteogénicas y vasculogénicas y, finalmente, una reabsorción que en nada dificulta la remodelación ósea natural. No obstante, la hidroxiapatita coralina está más indicada en implantes de metáfisis que en el hueso cortical diafisario, debido, sobre todo, a que la enorme carga que el tejido soporta en estas zonas pone en evidencia ciertas carencias de este material. El trifosfato cálcico ha resultado especialmente útil debido al efecto estimulador de los osteoclastos ejercido por los cristales de este material, lo que como es sabido, produce a su vez una activación de los osteoblastos, induciéndose así, la interacción entre las dos poblaciones de células óseas (productoras y destructoras) base del equilibrio tisular natural⁵⁷. En un intento de combinar las ventajas de ambos materiales, se han usado combinaciones de fosfato tricálcico e hidroxiapatita⁵⁸. Inicialmente, estos materiales no eran reabsorbibles pero sí biocompatibles, y permitían el crecimiento del tejido óseo en el interior de sus poros. Esta propiedad bioactiva depende del intercambio iónico con el hueso huésped y los fluidos orgánicos⁵⁹ ya que en su proceso de degradación son capaces de liberar iones como calcio y fosfato que difunden, estimulando la osteogénesis (osteoinductores), permitiendo la colonización ósea en el interior de sus poros (osteoconductores). Un implante, pues, con estructura cristalina similar a la del hueso, puede llegar a unirse biológicamente al mismo. No obstante, la respuesta ósea a las cerámicas de fosfato cálcico depende directamente de la naturaleza exacta de cada cerámica⁶⁰.

El uso de matrices de colágeno I, solo o en combinación con otros componentes extracelulares (ácido hialurónico, glucosaminoglucanos, fosfato cálcico, etc.) está muy extendido, tanto en reparación ósea como en cicatrización de heridas u otras reparaciones de tejidos blandos. La capacidad del colágeno I para unir proteínas importantes para la biología del hueso, factores de crecimiento e incluso células, unido a su carácter mediador de mineralización, hacen de este biomaterial un sustrato imprescindible en osteobiología²⁷. Si bien es cierto que su posible inmunogenicidad limita algo su uso indiscriminado, no es menos cierto que los estudios realizados demuestran que esta posibilidad no es alta, incluso en colágeno xenógeno; por ejemplo, los escasos anticuerpos encontrados en implantes de colágeno bovino en humanos, su escasa reactividad contra el colágeno humano y la falta de reacciones de hipersensibilidad observadas en los casos estudiados, abren grandes posibilidades al uso de esta proteína estructural en reparación ósea⁶¹.

Uno de los más usados es el polímero de ácido glicólico poliláctico, cuyos efectos indeseados son mínimos y sus posibilidades combinatorias con proteínas y factores de crecimiento son buenas^{62,63}, aunque la necesidad de altas temperaturas para formar espumas biodegradables dificulta esta última posibilidad. Resulta ser un material bien tolerado, pues origina una moderada respuesta inespecífica, tanto en la zona de implantación como en los ganglios regionales, caracterizada por una activación macrofágica responsable de la reabsorción del material desde la primera semana del implante. Con el avance tecnológico, los metales de distintas clases y presentaciones, han hecho aparición también entre los materiales osteoconductores. Cobalto, cromo, titanio y tántalo, solos o en aleaciones, presentan distintos grados de osteoconducción, usados sobre todo, como constituyentes principales o recubridores de prótesis de cadera, rodilla, etc. La técnica metalúrgica permite hoy día fabricar redes y esponjas metálicas con un tamaño y volumen de poro determinado, simulando las características de la matriz ósea.

Procesamiento *in vitro* de células osteogénicas

De lo expuesto hasta ahora se deduce claramente que el progreso de la osteobiología pasa por la conjunción de varios factores y circunstancias: células competentes, biofactores osteoinductores y materiales osteoconductores, unidos a un determinado microambiente tisular, sin olvidar el sometimiento a las condiciones biomecánicas propias de cada localización particular. El fallo de alguno o varios de ellos conduce al fracaso del proceso en las situaciones anormales o traumáticas conocidas.

El manejo de esas «circunstancias» irá proporcionando las claves para el control del proceso. Dentro de los avances habidos estos últimos años en el manejo de MSC *in vitro*, nuestro grupo ha desarrollado un sistema experimental para la selección, amplificación e inducción de dichas células hacia el linaje osteoblástico^{13,64,65}.

Desde principios de los años ochenta se sabe de la capacidad de formación de hueso por las células de la estroma de la médula ósea. Su implantación en animales vivos en cámara, de difusión, que aprovechan los factores humorales del huésped pero impiden la entrada de células del mismo, da lugar a la formación de hueso en el interior de dichas cámaras⁶⁶. No obstante, el cultivo *in vitro* per se de estas células no conduce a la diferenciación osteogénica, salvo que se añadan «agentes» externos. La adición a los cultivos de dexametasona (dex) y la suplementación con β-glicerofostato (β-GF) como fuente exógena de fosfatos^{67,68}, o bien la adición de «agentes bioactivos» primitivamente aislados de la matriz del hueso desmineralizado (DBM)⁶⁴, ha dado lugar a la inducción de diferenciación osteogénica en dichos cultivos, manifestada por cambios morfológicos y expresión de marcadores de hueso, como fosfatasa alcalina (FA), colágeno I, osteocalcina (OC), deposición de calcio, etc.

El uso combinado de dex, β-GF y DBM particulado, ha permitido diferenciar dos poblaciones celulares en los cultivos de MO de rata, una que crece y se diferencia en la primera semana de cultivo y otras que lo hace en la segunda y tercera semanas. Cuando las células proceden de animales viejos esta distinción desaparece paulatinamente, mostrándose que sólo la segunda de las poblaciones queda con capacidad de inducción osteogénica. Con ello se demostró que las células de MO con capacidad osteogénica disminuyen selectivamente con la edad, demostrándose además, que esa escasa población puede ser amplificada *in vitro* e inducida a expresar marcadores óseos cuando se pone en contacto con factores movilizados de la DBM⁶⁴ (fig. 3).

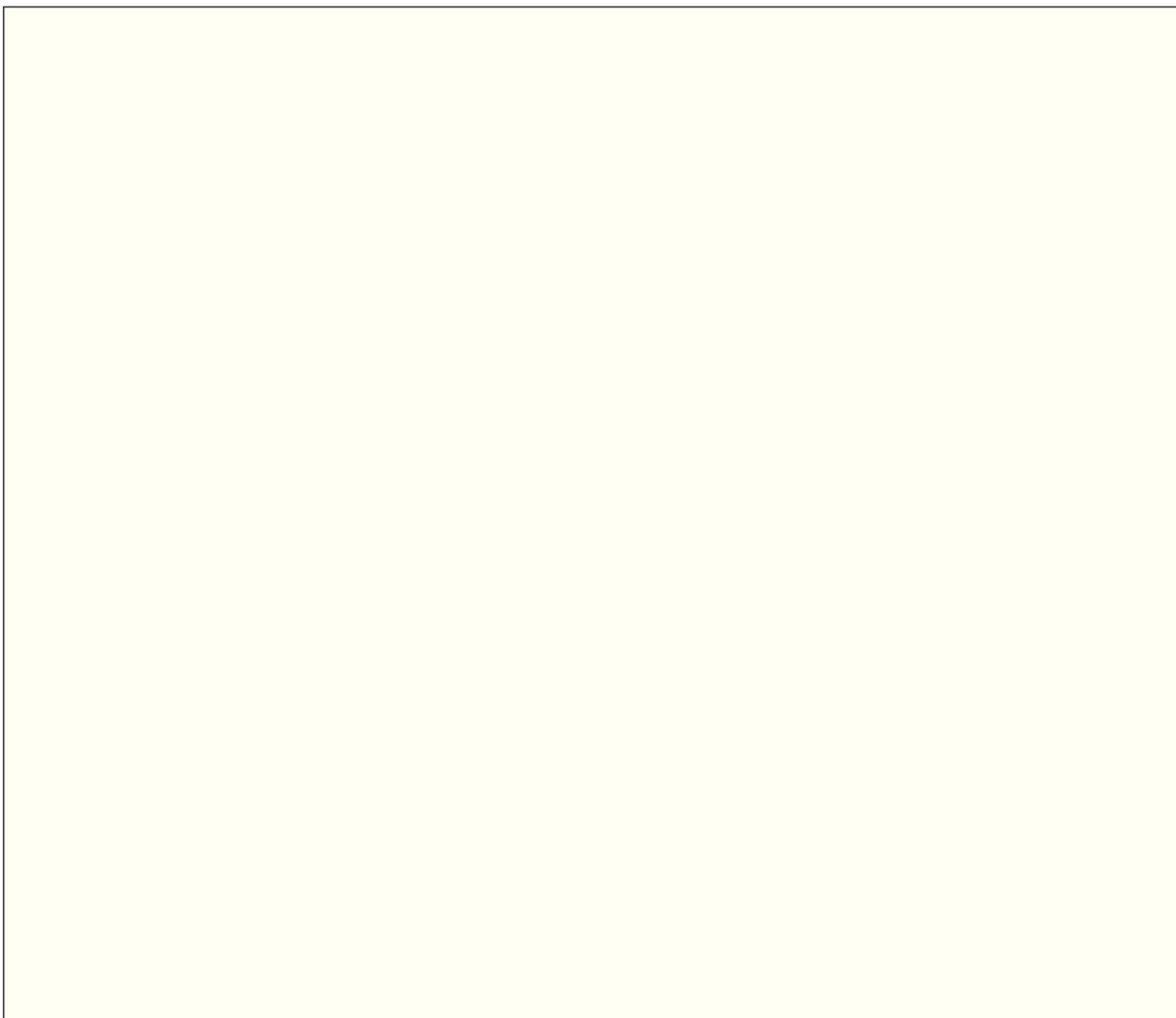


Fig. 3. Células de MO en cultivo bajo diferentes condiciones experimentales. a) Cultivo secundario de MO sobre plásticos que presenta el aspecto general de las células que tras el tratamiento adecuado podrán ser capacitadas como condroosteogénicas. $\times 450$. b) Las células anteriores convenientemente tratadas y, a veces espontáneamente, forman nódulos de diferenciación donde pueden expresar marcadores tisulares conectivos ($\times 30$). c) Células de MO cultivadas en gel de colágeno en un estadio temprano ($\times 60$). d) Las mismas células anteriores cultivadas en presencia de rhTGF- $\beta 1$ -F2 que induce la formación de colonias ($\times 60$). e) Células de MO como las mostradas en a), cultivadas en presencia de polvo de DBM (asterisco) que provoca la aglutinación de las células a su alrededor y la inducción de expresión de marcadores óseos ($\times 30$). f) Células de MO de ratas viejas (48 semanas) cultivadas como en e), que demuestra la presencia de células osteogénicas que, convenientemente amplificadas, se adhieren también a los trozos de DBM (asterisco) ($\times 30$). g) Cuando el polvo de DBM se inactiva parcialmente para destruir las proteínas distintas del colágeno, aparecen grandes zonas de las partículas a las que las células no se adhieren (flecha), lo que demuestra la responsabilidad de las proteínas extraídas en el proceso inductor de la aglutinación ($\times 30$). a-d, imágenes tomadas en fresco, con contraste de fases; e, cultivo fijado y teñido con hematoxilina-eosina y visto en campo oscuro; f-g, cultivos fijados y teñidos con picrosirio-hematoxilina, que tiñe de rojo la matriz colagénica.

En un intento de hacer una catalogación molecular de las MSC en distintos estadios de cultivo a lo largo del linaje osteoblástico, el grupo de Bruder ha obtenido diferentes anticuerpos monoclonales que reaccionan con la superficie de las MSC humanas, en diferentes estadios de dicho linaje^{69,70}. Los anticuerpos pueden usarse para localizar MSC y su progenie durante el desarrollo de huesos largos y calvaria. Estos estudios aunque útiles e interesantes, todavía no han dado los frutos que se espera de ellos.

A medida que se van aislando y caracterizando las moléculas que participan en la osteogénesis, la mayoría de ellas, presentes en la DBM usada indiscriminadamente como agente osteoinductor, tanto *in vitro* como *in vivo*, se va disecionando cuidadosamente el proceso. El TGF- $\beta 1$ y varias BMP son las más estudiadas, aunque no siempre con resul-

tados coherentes. El efecto del TGF- $\beta 1$ sobre la diferenciación osteoblastica *in vitro* es el que está produciendo resultados más conflictivos y, a veces, contradictorios.

A finales de los años ochenta, una serie de trabajos demostraban que el TGF- $\beta 1$ puede tener un efecto estimulante de la proliferación y expresión de marcadores propios de diferenciación ósea, en diferentes tipos celulares cultivados *in vitro*^{71,72}; otros demostraron su efecto contrario, es decir, inhibición de la expresión de FA, osteonectina y OC, así como falta de efecto sobre la proliferación celular^{73,74}. Tampoco faltarían los trabajos que achacaron estos resultados a un posible efecto bifásico del TGF- β no bien estudiado⁷⁵ o a diferencias en los resultados, probablemente, debido a cambios en las condiciones de cultivo⁷⁶. Nuestro grupo⁶⁵ ha demostrado fehacientemente que el TGF- $\beta 1$ tiene, sobre todo,

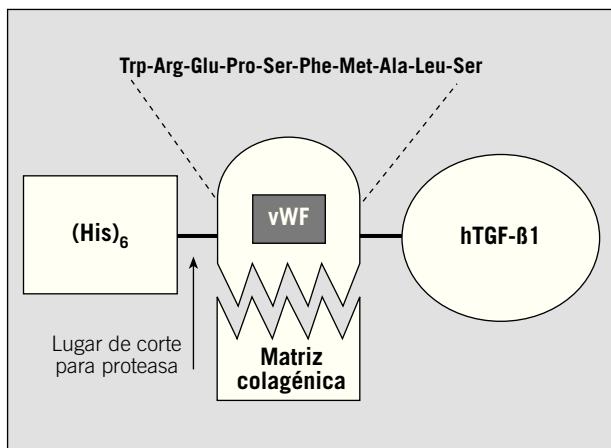


Fig. 4. Constitución molecular del TGF-β1 humano al que se añade un decápепtido (el factor de Von Willebrand) que le confiere especificidad de unión al colágeno I. El conjunto se completa con una cadena de 6 histidinas unidas por un lugar sensible a proteasas, lo que facilita su purificación.

efecto mitogénico y formador de colonias sobre células de MO cultivadas en geles de colágeno, siendo escasa pero apreciable, la capacidad de esas células para expresar marcadores óseos. Estas capacidades del TGF-β1 se magnifican cuando se usa un TGF-β1 al que se le añade un dominio molecular de unión específica al colágeno I (TGF-β1-F2) (fig. 4). Estas células, expandidas e inducidas *in vitro* bajo el influjo de este factor, llegan a producir tejido cartilaginoso y óseo, cuando se les implanta en animales en cámaras de difusión^{13,65} (fig. 5).

De las BMP, BMP-2 y OP-1 (BMP-7) han demostrado ampliamente su capacidad para promover diferenciación osteoblastica *in vitro*⁷⁷⁻⁷⁹. En algún caso, se ha demostrado incluso la existencia de dos poblaciones celulares en la MO⁷⁷ cuando se les aplica BMP-2 y dexametasona *in vitro*. Una de rápida diferenciación, y otra que precisa la exposición a los factores inductores durante más tiempo. Estos resultados concuerdan con los nuestros citados anteriormente, en relación con la inducción ejercida por las partículas de DBM sobre células de MO cultivadas⁶⁴.

Aplicación de las MSC procesadas *ex vivo* a la reparación ósea

Desde que Urist descubriera las proteínas morfogenéticas de hueso a mediados de los años sesenta, se ha sucedido la caracterización, el clonaje, expresión y purificación de varias de ellas. Estos hallazgos han estimulado el uso directo de tales proteínas en casos clínicos concretos donde se necesita un estímulo osteogénico suplementario, con resultados dispares pero alentadores^{7,51,52}. Pero, en todos los casos, la aplicación directa de BMP plantea tres problemas fundamentales: uno, la falta de control sobre el tiempo que la proteína aplicada permanece en la lesión, otro, la actividad de la misma y, otro, la necesidad de células osteogénicas en el lugar de aplicación, efectores últimos de la acción inductora. En aquellos casos en los que la falta de células, como consecuencia de la edad, sea el problema fundamental, la aplicación directa de factores osteoinductivos no producirá los resultados esperados^{64,80-82}. Por ello, una línea de actuación presente con gran proyección futura es aplicar células osteoprogenitoras a los lugares necesitados de reparación, bien solas, directamente, o a través de un transportador, como son los distintos materiales osteoconductores, sin descartar la posibilidad de inyección sistémica en condiciones determinadas que trataremos más adelante. A finales de los años noventa se ha empezado a utilizar las MSC cultivadas y manipuladas *ex vivo* para su uso en reparaciones óseas, hasta ahora de modo experimental. El grupo de Caplan y Bruder es uno de los más activos, y a ellos se deben los principales avances en este campo^{11,16,80}. En resumen, los avances más significativos se han obtenido cultivando y expandiendo *in vitro* MSC procedentes de MO, que posteriormente son transportadas a cilindros de hidroxiapatita/cerámica de fosfato tricálcico, colocados en defectos segmentales provocados. Estos experimentos se han realizado tanto entre ratas singénicas⁸¹ como usando MSC de médula humana y posteriormente implantadas en ratas atípicas para evitar el rechazo⁸⁰. Los resultados obtenidos por este procedimiento mejoran a los obtenidos con el uso directo del BMP adsorbidos sobre hidroxiapatita. Pero, en cualquier caso, no se consigna que el 100% de la hidroxiapatita quede infiltrada de hueso nuevo, después de 12 semanas de implantación. Además de estos resultados parcialmente satisfactorios, debe tenerse en cuenta que, en la

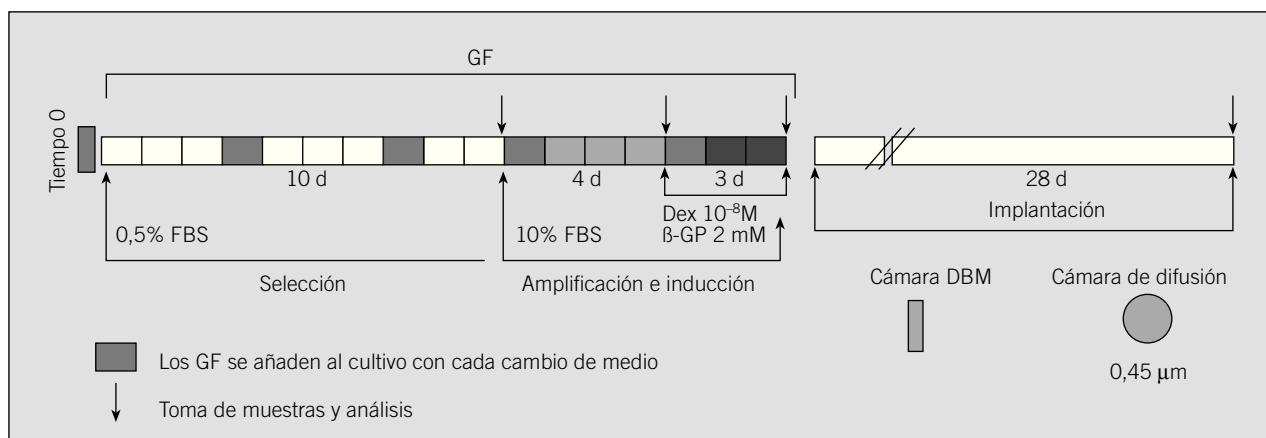


Fig. 5. Diagrama que presenta el procedimiento experimental seguido para capturar, amplificar e inducir hacia el linaje condroosteogénico, células de médula ósea en cultivo sobre geles de colágeno. Tras un período de 10 días de cultivo en baja concentración de suero (FBS, 0,5%), las células supervivientes se multiplican con un 10% de FBS durante 7 días más, añadiéndose en los dos últimos dexametasona y β-glicerofosfato para ayudar la osteoinducción. Durante estos días las células se mantienen en contacto con diferentes GF que modulan su proliferación y diferenciación. Después de este período de cultivo *in vitro* las células se liberan del cultivo y se introducen en cámaras de difusión o de DBM para implantación subcutánea en animales. Distintos análisis bioquímicos e histológicos realizados en diferentes momentos del proceso indicarán la histogénesis ocurrida.

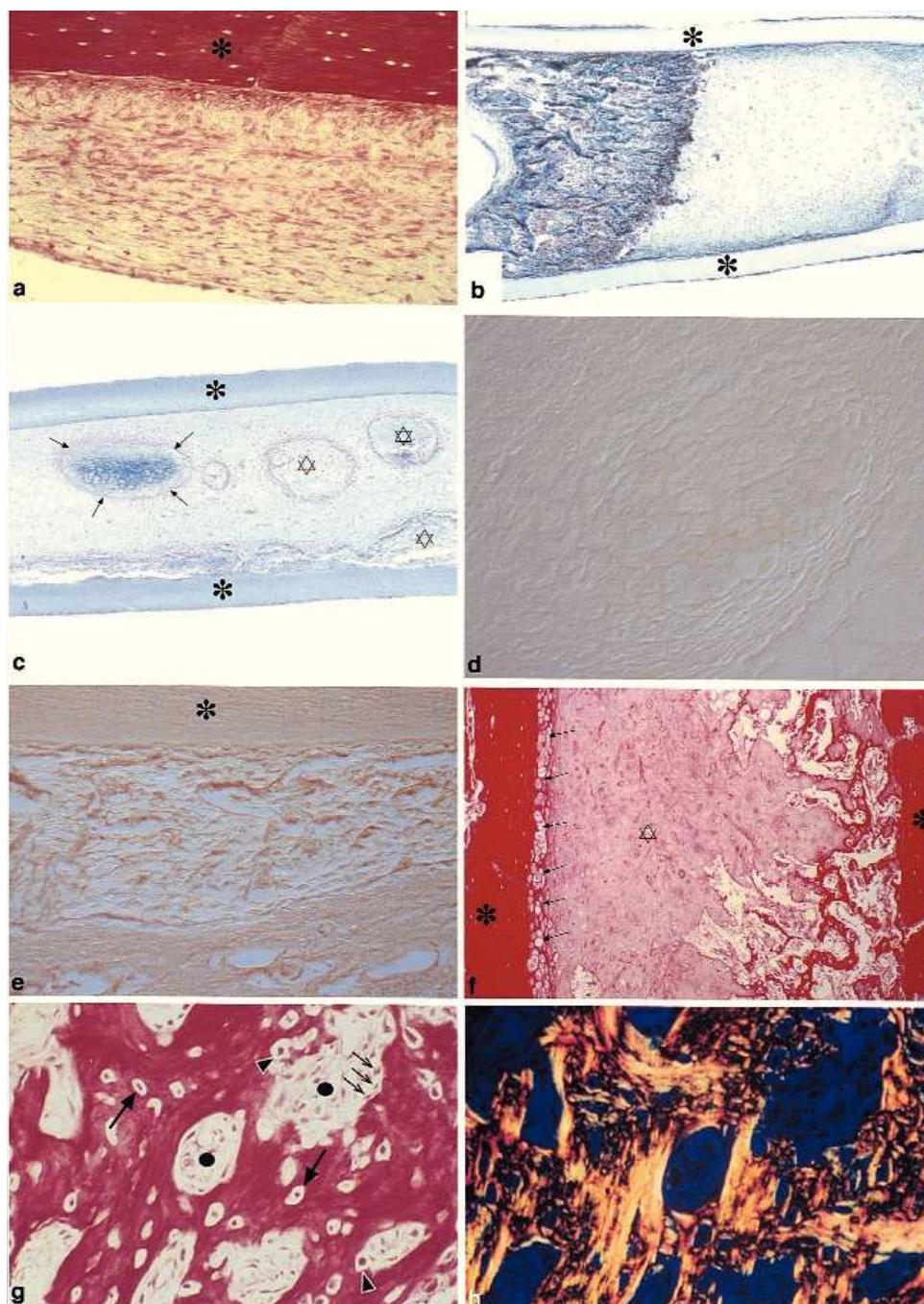
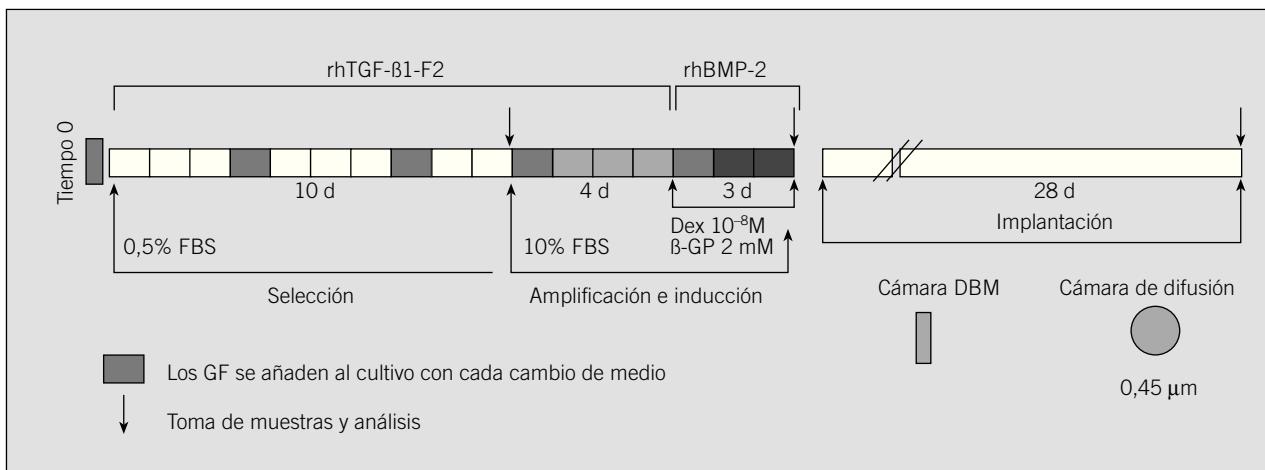


Fig. 6. Cortes histológicos de cámaras de difusión o de DBM que contienen las células de MO procesadas in vitro, tras un período de implantación subcutánea de 28 días en ratas de edad avanzada. a) Cámaras de DBM control, con células de MO que no recibieron ningún tratamiento in vitro, que presentan un tejido fibroso junto a la pared de la cámara (asterisco). Tinción picrosirio-hematoxilina ($\times 45$). b) Cámaras de difusión con células que fueron tratadas in vitro con rhBMP-2 y que forman una ósea trabecular (parte izquierda) junto a otro de tipo cartilaginoso (parte derecha). Tinción Gomori ($\times 40$). Los asteriscos señalan las paredes (filamentos) de la cámara. c) Cámaras de difusión entre cuyas paredes (asteriscos) se ha formado un tejido fibroso con extensas zonas de diferenciación cartilaginosa (flecha) y otras óseas (estrellas) en el centro de la cámara o adosadas a las paredes. Las células fueron tratadas in vitro con rh OP-1 (rhBMP-7). Tinción azul alciano ($\times 35$). d) Uno de los nódulos cartilaginosos en una sección contigua a la anterior, inmunoteñida para colágeno II, mostrando una débil positividad en el centro del nódulo ($\times 175$). e) Sección contigua a la expuesta en c) inmunoteñida para colágeno I, que presenta positividad en uno de los nódulos adosados a las paredes de la cámara (asterisco) ($\times 100$). f) Las células que se pusieron en esta cámara de DBM, fueron tratadas in vitro con rh OP-1 y formaron estre sus paredes (asterisco) zonas de tejido óseo trabecular (parte derecha), grandes zonas de aspecto cartilaginoso (estrella) y otras de cartílago más maduro junto a la pared de la izquierda (flechas). Todo ello parece representar un proceso de osificación endocondral. Tinción picrosirio-hematoxilina ($\times 40$). g) Vista ampliada de trabéculas óseas maduras formadas en una cámara como la anterior, con células tratadas con rhTGF- β -F2 donde pueden observarse osteoblastos (flechas pequeñas), osteocitos (flechas grandes), osteoclastos (cabezas de flecha) y cavidades medulares (punto negro). Tinción picrosirio-hematoxilina ($\times 175$). h) El mismo corte anterior visto con luz polarizada que demuestra un alto nivel de organización del colágeno en las trabéculas óseas neiformadas.

mayor parte de las situaciones en las que se producen defectos en la osificación en la clínica humana, se dan también trastornos metabólicos. Esto puede traducirse, no sólo en una falta de células osteocompetentes, sino también en una deficiente presencia de factores bioactivos. Así, puede entenderse que la manipulación *ex vivo* de las MSC debe ser llevada más allá del mero cultivo y expansión, para asegurar que el paciente necesitado reciba las células ya iniciadas en el camino osteoblástico.

Apoyados en algunos tímidos resultados publicados en 1994 por Liebergall et al.⁸⁵, que trataron MSC en cultivo con TGF- β y mostraron una aceleración significativa de la osificación al reimplantarlas en defectos óseos, así como en

nuestros propios datos experimentales, que muestran que las MSC cultivadas *in vitro* con distintos TGF- β y BMP son capaces de producir cartílago y hueso, cuando se les implanta ectópicamente en ratas de edad avanzada^{13,65} (fig. 6), hemos planteado una serie de experimentos, actualmente en curso, cuyos resultados preliminares son altamente esperanzadores. Nuestro planteamiento experimental se basa en el efecto sinérgico del TGF- β 1 y BMP y en el uso de estos factores con modificaciones moleculares que aseguren una presencia de los mismos «a disposición» de las células durante más tiempo, dirigiendo así el efecto de dichos factores. Si el sinergismo entre TGF- β 1 y OP-1⁴² o BMP-2⁸⁶ es un hecho demostrado en diferentes circunstan-

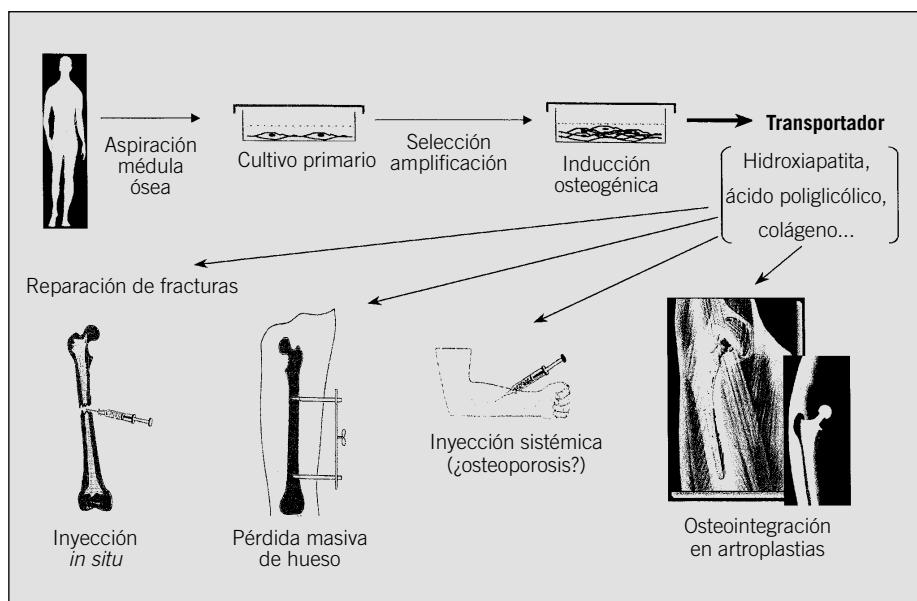


cias, y si el efecto de un TGF-β1, al que se le añade un dominio molecular de unión específica al colágeno I (TGF-β1-F2), sobre la amplificación e inducción osteogénicas de células de MO, es claramente mayor que el correspondiente al TGF-β1 comercial, nuestra propuesta experimental consiste en la amplificación de células osteocompetentes en geles de colágeno I en presencia de TGF-β1-F2 y posterior inducción en el mismo gel con BMP-2 y/o OP-1 también modificados para el mismo fin (fig. 7).

Posteriormente, estas células así amplificadas e inducidas, serán absorbidas en el biomaterial apropiado (hidroxiapatita sólida o en geles) para trasladarlas a los lugares donde se necesite reparación u osificación. En la figura 8 se representa la secuencia experimental que estamos siguiendo y que deberá conducir, no sólo a la mejora de la reparación ósea en variadas circunstancias, sino también a la mejora sustancial de la fijación secundaria de las arthroplastias por un procedimiento biológico que permitirá una mejor osteointegración de las prótesis.

Una mención especial merece el uso de este procedimiento para el tratamiento de la osteoporosis. En la medida en que ésta es una enfermedad sistémica en la que se produce un desequilibrio entre la formación y reabsorción ósea, en perjuicio de la primera, podemos especular que el suministro sistémico de células osteocapacitadas *in vitro* en tales enfermos, podría reacomodar la ecuación ósea en el camino de la normalización. Se trataría de cultivar las MSC del paciente, amplificarlas y osteoinducirlas *ex vivo*, para posteriormente, reinstalarlas en el enfermo con la esperanza de que repueblen el tejido óseo del mismo. El descubrimiento de una secuencia peptídica de la sialoproteína de hueso (BSP) mediadora de la unión específica de los osteoblastos a la hidroxiapatita, podrá ayudar en la orientación de las células reinyectadas hacia el tejido óseo⁸⁷.

El conocimiento de todos los detalles celulares y moleculares del proceso que apuntamos, unido al desarrollo del material osteoconductor apropiado para cada circunstancia, permitirá el avance de una auténtica bioingeniería tisular



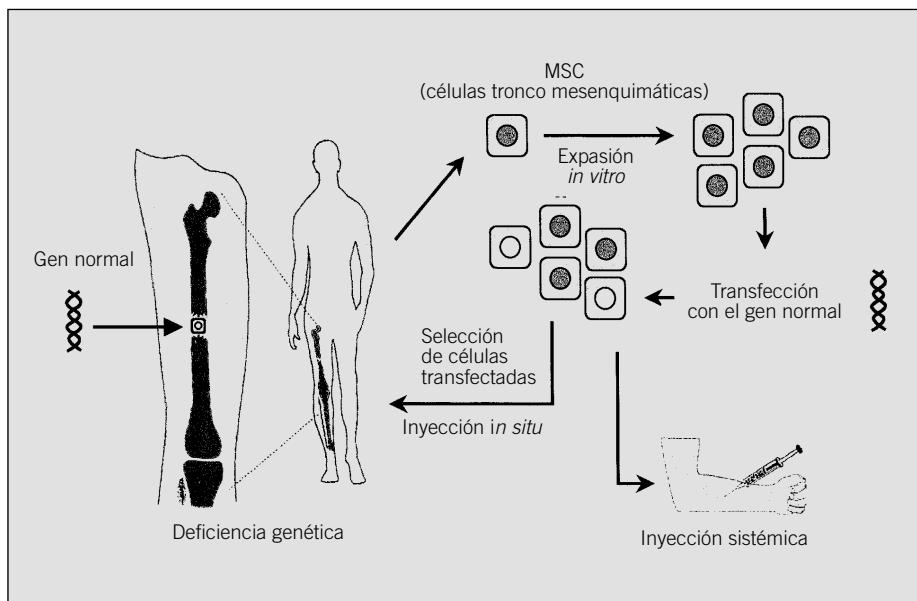


Fig. 9. Un protocolo de terapia génica como el que se indica, puede seguirse para el tratamiento de enfermedades óseas por deficiencia genética. En la medida en que esta tecnología solucione los problemas que tienen planteados en la actualidad, podrá ser aplicada en casos como los que se representan (v. texto).

que ofrecerá unas posibilidades terapéuticas, hasta ahora insospechadas. De momento, las empresas biofarmacéuticas están empeñadas en el uso directo de BMP en los lugares necesitados de reparación ósea, sin preocuparse demasiado del tiempo que realmente permanece el factor disponible con actividad, de la forma de presentación, cantidad, relación con las células o su vehiculización. De esta forma, se obtiene una mejoría, y eso justifica su uso. En nuestra opinión, el uso de estos factores y células biodirigidos mediante dominios moleculares específicos y combinados con biomateriales apropiados, es el futuro inmediato. Un futuro inmediato, pero no tanto, basado en estos mismos principios celulomoleculares, será el desarrollo de lo que hoy ya es un hecho en otros campos, la terapia génica, adaptada a las circunstancias propias de este caso. Como indica la figura 9, ya es posible transfecutar los cultivos de MSC expandidas, con genes específicos que tratan de sustituir un gen anómalo, como el de la osteogénesis imperfecta, o reparar una función perdida en estas células como puede ser la expresión de BMP o TGF- β , mediante la inserción del gen activo o el fragmento activador correspondiente. La reinyección de estas células modificadas en el mismo huésped del que proceden podrá restablecer la disfunción padecida. La terapia génica también puede aplicarse *in vivo*, transfecutando las células *in situ* mediante la introducción directa del fragmento de ADN deseado en un vector, a través de una matriz activada, como el colágeno. Por este procedimiento el gen transfecutado se incorpora al núcleo de las células de la fractura, las cuales transcriben la proteína para la que se introdujo el gen, elevando localmente la concentración de la misma. Este procedimiento es menos eficaz que la transfección *ex vivo*, a la vez que menos controlable, pero en ambos casos existen experimentos piloto, que avalan sus posibilidades terapéuticas a costes mucho más bajos que la producción de proteínas recombinantes para su uso directo.^{88,89}

El hecho de que las células transfecutadas permanezcan en el huésped poco tiempo (algunas semanas), lejos de ser un inconveniente, como lo es en otros tratamientos, en reparación ósea la desaparición de dichas células puede coincidir con la desaparición de su necesidad, una vez concluido el proceso reparador.

Conclusiones y perspectivas futuras

Hemos empezado este artículo hablando de regeneración y desarrollo, pues en la medida en que la regeneración ósea recapitula el desarrollo, un buen conocimiento de estos procesos permitirá avances significativos en la resolución de los problemas que plantea la reparación ósea.

Sabemos que varios factores de crecimiento y BMP se expresan en las fracturas desde los primeros momentos, pero los pasos anteriores son desconocidos. La función de los genes homeóticos durante el desarrollo probablemente tenga mucho que ver con el inicio de los procesos regenerativos o reparadores.

Conocemos bastante sobre la presencia y efectos de varios GF y citocinas en la reparación ósea, pero sabemos menos sobre la presencia y disponibilidad de los receptores apropiados. Sabemos que algunos de estos factores tienen acción bifásica, pero sabemos poco sobre la vida media de dichos factores y sobre la concentración necesaria para su actuación. De hecho, se conoce fehacientemente que las concentraciones a las que actúan estos factores, son mucho menores que las que normalmente se aplican en las fracturas cuando se usan proteínas recombinantes, y esto a pesar de los elevados costes de producción de estas sustancias. Un mejor conocimiento sobre las concentraciones de los GF, sus receptores e interacciones, así como sobre los mecanismos de vehiculización, abaratará su producción y mejorará la eficiencia.

La regeneración ósea depende de la existencia de MSC, activables e inducibles hacia el camino osteoblástico. Sabemos que estas células son residentes habituales del propio hueso, del perióstio y de la médula ósea, y que su número baja espectacularmente con la edad. No sabemos si la depresión de la respuesta reparadora con la edad es sólo una cuestión de número de células disponibles, falta de factores inductores o de receptores para los mismos, o todo ello a la vez. Es preciso profundizar en el conocimiento básico de estos fenómenos, a la vez que progresamos en la manipulación *ex vivo* de la MSC para su posible uso terapéutico, como el mejor de los trasplantes autólogos. Deben seguir buscándose nuevas fuentes de MSC de acceso más fácil y menos cruento. Las células inmaduras del linaje he-

matopoyético pueden ser candidatas y, por supuesto, las células embrionarias de los primeros estadios del desarrollo. El progreso en este camino permitirá el uso de los bancos de cordón umbilical, que ya son una realidad, o los de células embrionarias pluripotentes, cuyo uso precisa todavía de avances importantes, tanto científicos como jurídicos y sociales.

La singular arquitectura del tejido óseo, propicia el desarrollo del mundo de los materiales biosintéticos osteoconductores. Un buen biomaterial y un concienzudo tratamiento *ex vivo* de las MSC, que incluye avances importantes en la manipulación genética, son el presente y futuro de la bioingeniería tisular. Este camino permitirá, no sólo mejorar la reparación ósea de cualquier etiología, sino que hará posible la «fabricación» *ex vivo* de piezas óseas de un determinado tamaño que serán de gran utilidad para afrontar reparaciones óseas posttraumáticas de gran trascendencia física y psíquica. Pero «fabricar» tejido con características químicas y citohistológicas similares al hueso, no es hacer hueso funcional susceptible de osteointegración morfológica y funcional. El hueso es el resultado de la conjunción eficaz de factores biológicos y físicos. El conocimiento de estos últimos precisa avances importantes para que el final del proceso de reparación sea en todo comparable a la situación normal. Uno de los detalles de este microambiente fisiocoquímico lo constituye la vascularización. La osteogénesis es altamente exigente de angiogénesis. Sabemos más de MSC, TGF- β y BMP que de angiogénesis; la ingeniería tisular no avanzará suficientemente si no mejoramos nuestro conocimiento de la vascularización. La biología de las células endoteliales, los pericitos y los GF implicados como el VEGF (*vascular endothelial growth factor*), es otro campo que precisa expansión. La conjunción de estas líneas de actuación, células, GF, biomateriales, angiogénesis y entorno físico, permitirá avances en la clínica ortopédica no soñados hasta ahora.

Agradecimiento

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (SAF99/0133), junta de Andalucía (PAI, CVI/0217), Universidad de Málaga, Fundación Mapfre Medicina, Hospital Costa del Sol (Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología) y Howmedica Ibérica S.A.

Abreviaturas

BMP	Proteína morfogenética de hueso (<i>bone morphogenetic protein</i>)
BSP	Sialoproteína de hueso (<i>bone sialo-protein</i>)
β -GF	β -glicerofosfato
DBM	Matriz de hueso desmineralizada (<i>demineralized bone matrix</i>)
dex	Dexametasona
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<i>epidermal growth factor</i>)
FA	Fosfatasa alcalina
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico (<i>fibroblast growth factor</i>)
GF	Factor de crecimiento (<i>growth factor</i>)
IGF	Factor de crecimiento insulínico (<i>insuline-like growth factor</i>)
MO	Médula ósea
MSC	Célula madre mesenquimatosa (<i>mesenchymal stem cell</i>)
OC	Osteocalcina
OP-1	Proteína osteogénica 1 (<i>osteogenic protein</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>platelet derived growth factor</i>)
rh-	Recombinante humano
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β (<i>transforming growth factor</i>)
TGF- β 1-F2	TGF- β 1 con un dominio molecular de unión al colágeno I
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Stocum DL. Limb regeneration: re-entering the cell cycle. *Curr Biol* 1999; 9: 644-646.
- Stocum DL. New Tissues from Old. *Science* 1997; 276: 15.
- Brookes JP. Amphibian Limb Regeneration: Rebuilding a Complex Structure. *Science* 1997; 276: 81-87.
- Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating development and hormoneregulated expression of genes in osteoblasts: An integrate relationship of cell growth and differentiation. En: Noda M, editor. *Cellular and molecular biology of bone*. San Diego: Academic Press; 1993: 47-95.
- Hinchliffe J, Johnson D. The development of the Vertebrate Limb. Nueva York: Oxford Press, 1980.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 1988; 242: 1528-1534.
- Einhorn TA. The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355 (Supl): 7-21.
- Marsh D. Concepts of Fracture Union, Delayed Union, and Nonunion. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355 (Supl): 22-30.
- Byers P, Bonadio J. The molecular basis of clinica heterogeneity of osteogenesis imperfecta: mutations in type I collagen genes have different effects on collagen processing. En: Lloyd J, Scriver C, editores. *Genetic and metabolic diseases in pediatrics*. Londres: Butterworth, 1985; 56-90.
- Haynesworth SE, Goldberg VM, Caplan AI. Diminution of the number of mesenchymal stem cells as a cause for skeletal aging. En: Buckwalter JA, Goldberg VM, Woo SLY, editores. *Musculoskeletal soft-tissue aging: impact on mobility*. Section 1, Chapter 7. Rosemont: AAOS, 1994; 80-86.
- Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadriyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1998; 16: 155-162.
- Connolly JF. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355 (Supl): 257-266.
- Andrades JA, Nimni ME, Santamaría JA, Becerra J. Bone Marrow cells induced in vitro by a modified human TGF- β 1 form cartilage and bone when they are implanted *in vivo*. *Bone*. En prensa.
- Lane JM. Biologic Enhancement of Fracture Repair. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355 (Supl): 359-360.
- Rosier RN. Regional Gene Therapy. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355 (Supl): 361-363.
- Caplan AI, Bruder SP. Cell and molecular engineering of bone regeneration. En: Lanza R, Langer R, Chick W, editores. *Textbook of tissue engineering*. Georgetown: RG Landes Company, 1997; 603-618.
- Owen M. Linage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. En: Peck WA, editor. *Bone and mineral research*. Amsterdam: Elsevier, 1985; 3: 1-25.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-650.
- Broudy V, Zuckerman S, Jemalani S, Fitchen J, Bagby G. Monocytes stimulates fibroblastoid bone marrow stromal cells to produce multilineage hematopoietic growth factors. *Blood* 1986; 68: 530-534.
- Triffitt J. Initiation and enhancement of bone formation: a review. *Acta Orthop Scand* 1987; 58: 673-684.
- Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994; 21: 429-435.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
- Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD et al. Culture adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4857-4861.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI et al. Mesenchymal cell-based repair of large full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1994; 76: 579-592.
- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrinol Rev* 2000; 21: 115-137.
- Nimni ME. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. En: Elsevier. *Biomaterials* 1997; 18: 1201-1225.
- Reddi AJ. BMPs: Actions in flesh and bone. *Nat Med* 1997; 3: 837-839.
- Trippel SB. Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355 (Supl): 301-313.
- Trippel SB. Bone formation and repair. En: Brighton CT, Friedlaender G, Lane JM, editores. *Biologic regulation of bone growth*. Rosemont, IL: Am Acad Orthop Surg 1994; 39-60.
- Balk SD, Whitfield JF, Youdale T, Brown AC. Roles of calcium, serum, plasma and folic acid in the control of proliferation of normal and rouse sarcoma-virus infected chicken fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 675-679.
- Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of external smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 1207-1210.
- Yarden Y, Ulrich A. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Ann Rev Biochem* 1988; 57: 443-478.
- McGill JJ, Strates BS, McGuire MH. Stimulation of osteogenesis by PDGF and TGF adsorbed on microcrystals of hydroxyapatite. *J Bone Min Res* 1990; 6 (Supl 1): 503.
- McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Effects of fibroblast growth factors on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in rat parietal bone cells. *Endocrinology* 1989; 125: 2118-2126.

35. Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *Cell Biol* 1989; 109: 1-6.
36. Radomsky ML, Thompson AY, Spiro RC, Poser JW. Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin Orthop* 1998; 355 (Supl): 283-293.
37. Nagai H, Tsukuda R, Mayahara H. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in growing rats. *Bone* 1995; 16: 367-373.
38. Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high molecular hyaluronic acid. *Bone* 1995; 16: 9-15.
39. Kingsley DM. The transforming growth factor beta superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994; 8: 133-146.
40. Bostrom MPG, Asnis P. Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355 (Supl): 124-131.
41. Oreffo RO, Bonewald L, Kukita A, Garrett IR, Seyedin SM, Rosen D et al. Inhibitory effects of the bone-derived growth factors osteoinductive factor and transforming growth factor-beta on isolated osteoclasts. *Endocrinology* 1990; 126: 3069-3075.
42. Duneas N, Crooks J, Ripamonti U. Transforming growth factor- β 1: induction of bone morphogenetic protein gene expression during endochondral bone formation in the baboon, and synergistic interaction with osteogenic protein-1 (BMP-7). *Growth factors* 1998; 15: 259-277.
43. Rosier RN, O'Keefe RJ, Hicks DG. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355 (Supl): 294-300.
44. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-899.
45. Reddi AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355: 66-72.
46. Bostrom MPG. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355 (Supl): 116-123.
47. Yang LJ, Jin Y. Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions. *Clin Orthop* 1990; 257: 249-256.
48. Kawaguchi H, Kurokawa T, Hoshino Y, Kawahara H, Ogata E, Matsumoto T. Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in the ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. *Spine* 1992; 17: 33-36.
49. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic protein 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 1995; 13: 357-367.
50. Bostrom M, Lane JM, Tomin E, Browne M, Berberian W, Turek T et al. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop* 1996; 327: 272-282.
51. Cook SD. Acceleration of bone healing with OP-1 in a canine noncritical size defect model. Second International OP-1 Conference. Boston, MA, 1997.
52. Bonn D. The application of cell biology to broken bones. *Lancet* 1999; 353: 650.
53. Second International OP-1 Conference. Boston, MA, 1997.
54. International Conference on Bone Morphogenetic Proteins. Lake Tahoe, CA, 2000.
55. Cheal EJ, Mansmann KA, DiGioia AM III, Hayes WC, Perren SM. Role of interfragmentary strain in fracture healing of a healing osteotomy. *J Orthop Res* 1991; 9: 131-142.
56. Chiroff R, Weber J, White E. Tissue in growth of replamineform implants. *J Biomed Mater Res* 1975; 6: 29.
57. Frost H. A New direction for osteoporosis research: A review and proposal. *Bone* 1991; 12: 249-437.
58. Moore DC, Chapman MW, Manske D. The evaluation of a biphasic calcium phosphate ceramic for use in grafting long bone diaphyseal defects. *J Orthop Res* 1987; 5: 356-365.
59. De Groot R. Effect of porosity and fisicochemical properties on the stability, resorption and strength of calcium phosphate ceramics. *Ann NY Acad Sci* 1998; 523: 227-233.
60. Nimb L, Gottfredsen K, Jensen JS. Interface mechanics and histomorphometric analysis of different types of bioceramics in canine bone. *Acta Orthop Scand* 1992; 63: 28-32.
61. Chapman MW, Bucholz R, Cornell CN. Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material: a randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg* 1997; 79A: 495-502.
62. Hollinger JO, Battistone GC. Biodegradable bone repair materials: synthetic polymers and ceramics. *Clin Orthop* 1986; 207: 290-305.
63. Laurencin CT, Lane JM. Poly (lactic acid) and poly (glycolic acid): orthopaedic surgery applications. En: Brighton CT, Friedlaender GE, Lane JM, editores. *Bone formation and repair*. Park Ridge, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons Symposium, 1994; 325-339.
64. Becerra J, Andrades JA, Ertl DC, Sorgente N, Nimni ME. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells *in vitro*: effect of age of cell donor. *J Bone Min Res* 1996; 11: 1703-1714.
65. Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Nimni ME. A recombinant human TGF- β 1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Exp Cell Res* 1999; 250: 485-498.
66. Mardon HJ, Bee J, Von der Mark K, Owen ME. Development of osteogenic tissue in diffusion chambers from early precursors cells in bone marrow of adult rats. *Cell Tissue Res* 1987; 250: 157-165.
67. Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1988; 254: 317-330.
68. Herbertson A, Aubin JE. Dexamethasone alters the subpopulation make-up of rat bone marrow stromal cell cultures. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 285-294.
69. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 1997; 21: 225-235.
70. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355 (Supl): 247-256.
71. Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin: biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop* 1998; 226: 267-291.
72. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 1987; 262: 2869-2874.
73. Robey PG, Young M, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH et al. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) *in vitro*. *J Cell Biol* 1987; 105: 457-463.
74. Noda M. Transcriptional regulation of osteocalcin production by transforming growth factor-beta in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1989; 124: 612-617.
75. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E, Connecticut H. Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg* 1991; 73 (Supl A): 1418-1428.
76. Bonewald LF, Mundy R. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat R* 1990; 250: 261-276.
77. Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 1994; 161: 218-228.
78. Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 1995; 95: 881-887.
79. Sampath TK, Malaiakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation *in vivo* with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation *in vitro*. *J Biol Chem* 1992; 267: 20352-20362.
80. Bergman J, Gazit D, Kahn AJ, Gruber H, McDougall S, Hahn TJ. Age-related changes in osteogenic stem cell in mice. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 568-577.
81. Inoue K, Ohgushi H, Yoshikawa T, Okumura M, Sempuku T, Tamai S et al. The effect of aging on bone formation in porous hydroxyapatite: Biochemical and histological analysis. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 989-994.
82. Quarto R, Thoma D, Liang T. Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif Tissue Int* 1995; 56: 123-129.
83. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 655-663.
84. Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Enf* 1997; 3: 173-185.
85. Liebergall M, Young RG, Ozawa N. The effects of cellular manipulation and TGF- β in a composite bone graft. En: Brighton CT, Friedlaender GE, Lane JM, editores. *Bone formation and repair*. Chapter 26. Rosemont: AAOS, 1994; 367-377.
86. Si X, Jin Y, Yang L. Induction of new bone by ceramic bovine bone with recombinant human bone morphogenetic protein 2 and transforming growth factor beta. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998; 27: 310-314.
87. Fujisawa R, Mizuno M, Nodasaka Y, Kuboki Y. Attachment of osteoblastic cells to hydroxyapatite crystals by a synthetic peptide (Glu-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr) containing two functional sequences of bone sialoprotein. En: Fischer G, editor. Verlag. Matrix Biology, 1997; 16: 21-28.
88. Niyibizi C, Baltzer A, Lattermann C, Oyama M, Whalen JD, Robbins PD et al. Potential role for gene therapy in the enhancement of fracture healing. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355 (Supl): 148-153.
89. Goldstein SA, Bonadio J. Potential role for direct gene transfer in the enhancement of fracture healing. *Clin Orthop Relat R* 1998; 355: 154-162.