



**Universidad de Oviedo**

**Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias**

**Máster en Biomedicina y Oncología Molecular**

# **Tratamiento de defectos óseos mediante técnicas de ingeniería tisular**

**Beatriz Menéndez-Abascal Fernández**

**13 de Julio de 2016**

**Trabajo Fin de Máster**

## ÍNDICE

<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>2</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>4</b>
Composición del tejido óseo .....	4
Regeneración de tejido óseo.....	4
Defectos óseos.....	6
Ingeniería tisular .....	7
Características de los soportes .....	9
Soportes para defectos óseos.....	10
Células troncales mesenquimales.....	12
<b>Hipótesis .....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>14</b>
<b>Material y métodos.....</b>	<b>15</b>
Sujetos de estudio.....	¡Error! Marcador no definido.
Fabricación del soporte .....	¡Error! Marcador no definido.
Obtención de células mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs).....	¡Error! Marcador no definido.
Combinación de BM-MSCs con el soporte .....	¡Error! Marcador no definido.
Cirugía .....	¡Error! Marcador no definido.
Grupos experimentales .....	¡Error! Marcador no definido.
estudios de imagen .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>Resultados .....</b>	<b>15</b>
Estudio del soporte.....	¡Error! Marcador no definido.
Análisis de la diferenciación celular .....	¡Error! Marcador no definido.
Estudio radiológico y macroscópico de los huesos neo-generados tras el trasplante ....	¡Error! Marcador no definido.
Análisis de la microestructura de los huesos neo-generados...	¡Error! Marcador no definido.
<b>Discusión .....</b>	<b>15</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>15</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>16</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>AT-MSCs</b>	Células Mesenquimales de tejido Adiposo
<b>BM-MSCs</b>	Células Mesenquimales de Médula Ósea
<b>BMPs</b>	Proteínas Morfogénicas del hueso
<b>GAGs</b>	Glicosaminoglicanos
<b>HFIP</b>	Hexafluoroisopropanol
<b>MDSCs</b>	Células Mesenquimales de Músculo Esquelético
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>MHC-II</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad II
<b>MNCs</b>	Células de la Fracción Mononuclear
<b>MSCs</b>	Células Mesenquimales
<b>PGA</b>	Ácido poliglicólico
<b>PLA</b>	Ácido poliláctico
<b>PMSCs</b>	Células Mesenquimales de Placenta
<b>SPF</b>	Condiciones Libres de Patógenos
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular

## RESUMEN

---

Los defectos óseos se producen como consecuencia de traumatismos graves, deformaciones congénitas o por patologías como el cáncer. La opción de tratamiento más utilizada y con mejores resultados, es el trasplante de hueso autólogo; sin embargo, esta estrategia presenta ciertas limitaciones como la morbilidad asociada a la obtención del hueso. Por esta razón, la comunidad científica está trabajando en el diseño de alternativas al autoinjerto óseo basadas en la ingeniería tisular, cuyo principal objetivo es favorecer el desarrollo de nuevos tejidos u órganos a partir de biomateriales que soportan y ayudan a la proliferación y diferenciación de distintos tipos celulares. En el presente trabajo de Fin de Máster, se plantea la creación de un soporte natural basado en dos biomateriales: el suero sanguíneo y la fibroína de la seda y combinado con células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs). Dicho soporte es biocompatible, biodegradable y osteoconductor, lo que lo convierte en un soporte ideal para la generación del neo-tejido en el defecto óseo. Las BM-MSCs son células pluripotentes capaces de diferenciarse hacia distintos tipos celulares como los osteoblastos. Las BM-MSCs se obtienen a partir de la médula ósea de los propios animales garantizando su carácter autólogo y, por tanto, eliminando toda posibilidad de rechazo por parte de los animales receptores. El objetivo principal del estudio es conseguir la regeneración del tejido óseo en el defecto provocado en el radio de los animales mediante el trasplante del soporte de fibroína de la seda y suero sanguíneo autólogo junto con BM-MSCs, también autólogas.

## INTRODUCCIÓN

---

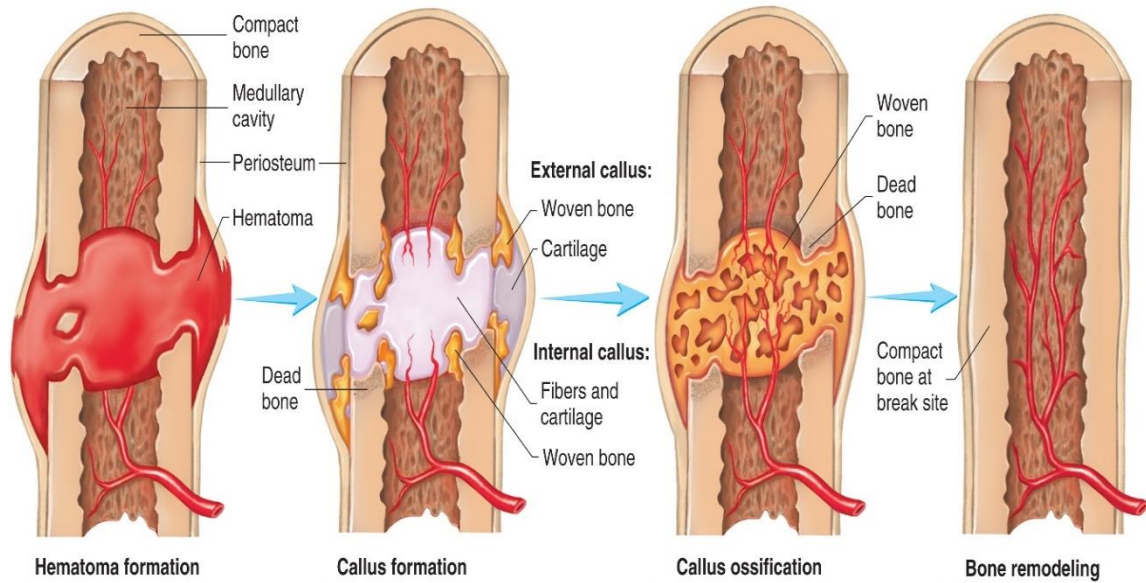
### COMPOSICIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo se caracteriza por presentar componentes de naturaleza orgánica e inorgánica. Estos últimos, los componentes inorgánicos, representan dos tercios del volumen total del hueso y cuentan con sales como: calcio, fosfato, carbonato, citrato e iones como el magnesio, sodio y fluoruro todos ellos, en forma de cristales de hidroxiapatita (Glimcher *et al.*, 1987). Por otro lado, la parte orgánica del hueso está formada, principalmente, por colágeno tipo I además de factores de crecimiento, osteonectina, proteoglicanos y proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) (Zigdon-Giladi *et al.*, 2016).

En cuanto a la composición celular del tejido óseo, encontramos tres tipos celulares: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos, originados a partir de células mesenquimales (MSCs), tienen la función de producir la matriz inorgánica, así como la supervisión del proceso de mineralización a través de la secreción de fosfatasa alcalina. Estas células, se diferencian hacia el segundo tipo celular más característico del hueso, los osteocitos quienes se encargan de la regeneración ósea tras una fractura (Lanyon 1993 y Einhorn *et al.*, 1995). Finalmente, los osteoclastos, son los responsables de la reabsorción de la matriz ósea en el proceso de remodelación, transformación de hueso inmaduro a hueso maduro (Roodman *et al.*, 1996).

### REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO

Tras una fractura, el hueso, a diferencia de otros tejidos, es capaz de reconstruir el tejido fragmentado siguiendo cada uno de los procesos que están implicados en el desarrollo del mismo. Se conocen dos procesos de regeneración ósea tras una fractura: regeneración directa o primaria y regeneración indirecta o secundaria. La principal diferencia se centra en la formación de callo resistente, la cual se da tan solo en la regeneración secundaria (Tsiridis *et al.*, 2007). Esta última es la más común y comprende cuatro etapas bien diferenciadas (Fig.1): periodo inflamatorio o formación de hematoma, formación de callo de fractura, osificación del callo de fractura y remodelación ósea (Silberman y Varaona, 2010).



**Figura 1.-Esquema de las cuatro etapas de la regeneración ósea.** En la figura se aprecian las cuatro etapas o estadios principales del proceso de regeneración ósea: Formación del hematoma, formación del callo de fractura, osificación del callo de fractura y remodelación. (Adaptado de *MacGraw-Hill Companies*, 2010).

El primero de los acontecimientos que ocurre tras una fractura, es la formación de un hematoma, consecuencia directa de un proceso inflamatorio. Hacia el foco de fractura se dirigen numerosas moléculas proinflamatorias como las interleuquinas 1, 6, 11 y 18 (IL-1, IL-6, IL-11 e IL-18) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Ambas moléculas se encargan de reclutar células del sistema inmune hacia el foco de fractura además de promover la angiogénesis a través de la estimulación de la producción de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) por parte de los osteoblastos (Sfeir C. *et al.*, 2005). El hematoma está compuesto por células procedentes de sangre periférica, así como por células de médula ósea. Entre ellas cabe destacar las células troncales o *Stem Cells* que se diferenciarán hacia células osteogénicas encargadas de formar el nuevo hueso. Por todo ello, la formación del hematoma es imprescindible para la consiguiente regeneración ósea ya que éste, cumple la función de pegamento entre los dos extremos óseos de la fractura (Marsell y Einhorn, 2011).

Tras el periodo inflamatorio comienza la formación del callo de fractura constituido por el callo blando o cartilaginoso y el callo duro u óseo. Células troncales del periostio se diferencian y proliferan hacia condroblastos y osteoblastos, las cuales migran hacia la zona más proximal y distal del foco de fractura, respectivamente. En primer lugar, se crea el callo blando, formado por cartílago hialino y colágeno tipo II aportando una mayor estabilidad (Dimitriou *et al.*, 2005). Del mismo modo y en la zona distal del foco de fractura, se forma el denominado callo duro constituido por tejido óseo

inmaduro a partir de osteoblastos, proceso que se conoce como osificación endomembranosa (Silberman y Varaona. 2010).

Con el fin de completar el proceso de regeneración ósea, el callo de fractura ha de ser reabsorbido y reemplazado por hueso duro, proceso que se denomina osificación endocondral. Durante este proceso las células troncales se diferencian hacia osteoblastos y osteoclastos, y se lleva a cabo la formación de matriz extracelular ósea. Se ha visto que durante esta diferenciación moléculas como las de la familia Wnt, concretamente Wnt-3a, participan en diversas cascadas enzimáticas para el mantenimiento de la diferenciación y proliferación de MSCs regeneración ósea (Chen *et al.* 2009). A medida que la formación de hueso duro avanza, células del cartílago como los condrocitos se vuelven hipertróficos y comienzan a degradar la matriz cartilaginosa para poder ser reemplazada por una matriz ósea calcificada. En el proceso de calcificación la mitocondria acumula calcio, creado en el ambiente hipóxico del foco de fractura. Dicho calcio precipita en la matriz extracelular que junto con el fosfato forman los primeros depósitos minerales de la matriz (Marsell y Einhorn, 2011). Por último, se ha de restablecer el flujo sanguíneo a través de la formación de nuevos vasos que suministren oxígeno y nutrientes al nuevo tejido. Este proceso está regulado, básicamente, por VEGF y por angiopoyetinas, principales factores propulsores de la angiogénesis (Tsiridis *et al.*, 2007).

Finalmente, tiene lugar la última de las etapas denominada, remodelación ósea. El hueso formado posee cierta dureza sin embargo, es de carácter inmaduro, similar al de los huesos fetales, por lo que no cumple los requisitos biomecánicos de los huesos adultos. Debido a esto se lleva a cabo una segunda reabsorción ósea por medio de los osteoclastos para después permitir la formación de hueso lamelar o cortical por medio de los osteoblastos (Gerstenfeld *et al.*, 2003).

## DEFECTOS ÓSEOS

La mayoría de las fracturas óseas se regeneran sin problema; sin embargo, existe un pequeño porcentaje de personas cuyos procesos de regeneración tisular presentan un retraso en el proceso curativo o bien, una mala unión entre los huesos pertinentes, surgiendo los denominados defectos óseos. Generalmente, estos defectos van acompañados de malformaciones óseas aparentes a simple vista y que dificultan, en gran medida, la calidad de vida del paciente. Además de como consecuencia de traumatismos graves, los defectos óseos pueden aparecer debido a infecciones,



deformaciones congénitas o asociados a patologías como el cáncer. Por otro lado, cabe destacar la existencia de factores de riesgo como el tabaco o enfermedades como la diabetes tipo II, la obesidad o la osteoporosis que aumentan, en gran medida, las probabilidades de padecer defectos óseos (Grayson *et al.*, 2015).

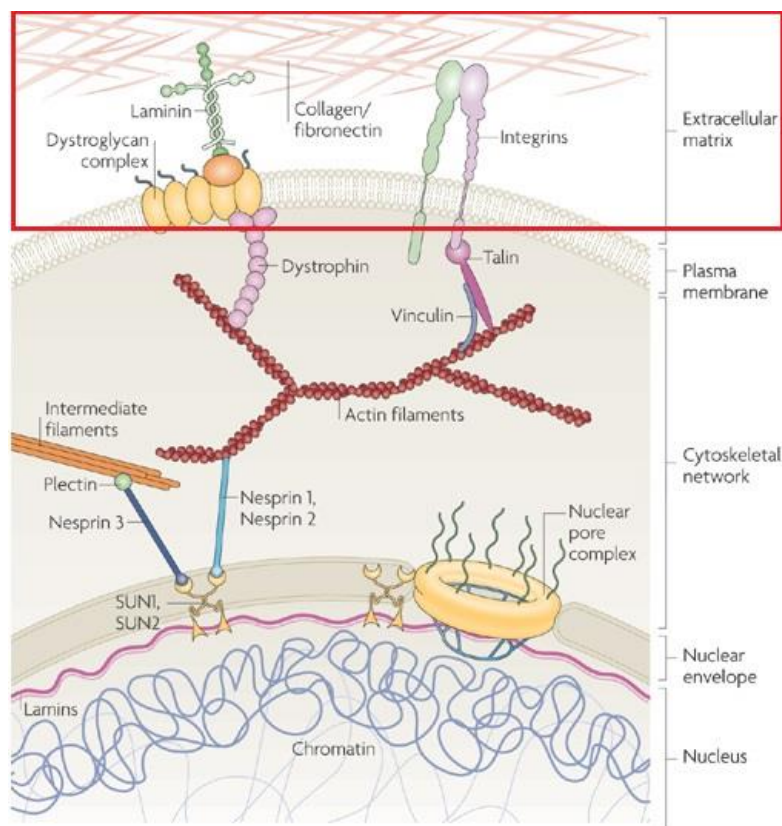
Con el fin de reparar dichos defectos óseos y mejorar la calidad de vida del paciente, se han barajado diversas alternativas. Actualmente, los procedimientos quirúrgicos reconstructivos basados en el trasplante de hueso autólogo, obtenido del propio paciente, sería la mejor elección puesto que se eliminaría uno de los principales problemas de los trasplantes, el riesgo al rechazo. Además, el injerto de hueso autólogo cuenta con importantes propiedades como la osteogenicidad (capacidad de formación de nuevo hueso), osteoconductividad (capacidad para proporcionar un andamio que permita la formación del nuevo tejido óseo) y osteoinductividad (capacidad de inducir el reclutamiento de células osteoformadoras mediante la presencia de factores como las BMPs). Existen hasta cuatro grupos diferentes de BMPs, cada uno de los cuales juega un papel distinto en la regeneración ósea. Algunas de sus funciones más importantes son la proliferación y diferenciación de las MSCs y células osteoprogenitoras, la angiogénesis y el control de la síntesis de la matriz extracelular ósea (Prisell *et al.*, 1993). Aún teniendo todo esto en cuenta, el trasplante del autoinjerto cuenta con tres principales limitaciones: la baja disponibilidad de hueso del propio paciente, la morbilidad asociada a su extracción y la necrosis total del trasplante. Por esta razón, es de vital importancia encontrar un sustituto biológico capaz de cumplir las propiedades del autoinjerto evitando sus principales desventajas.

## INGENIERÍA TISULAR

La ingeniería tisular es una disciplina de la medicina regenerativa que abarca diversos campos científicos y técnicos como son la biología molecular, la medicina y la ingeniería de biomateriales. Esta disciplina promete revolucionar y mejorar los tratamientos biomédicos utilizados hasta ahora gracias a su capacidad para restaurar, mantener e intensificar las funciones fisiológicas de tejidos y órganos (Petrovic *et al.*, 2012). La ingeniería de tejidos tiene como objetivo principal la reparación o sustitución de tejidos dañados a través de la generación *in vitro* de tejidos u órganos totalmente funcionales.

Con la ingeniería tisular se pretende imitar los distintos eventos biológicos como es la señalización extra e intracelular además de las diversas interacciones que existen

entre las células y estructuras acelulares como la matriz extracelular (MEC). La relación entre ambas es totalmente dinámica, donde las células producen y reforman la matriz mientras que ésta controla la integridad del tejido y el comportamiento celular (Fig.2). La MEC se encuentra repartida entre los espacios intercelulares proporcionando a las células un soporte de adhesión sobre el que crecer, diferenciarse y migrar (Cooper y Hausman, 2011). La MEC es una estructura tridimensional compuesta por una compleja combinación de proteínas, moléculas estructurales como el colágeno, la fibronectina, la laminina e integrinas y moléculas funcionales como los glicosaminoglicanos (GAGs) y factores de crecimiento (Badylak, 2005).

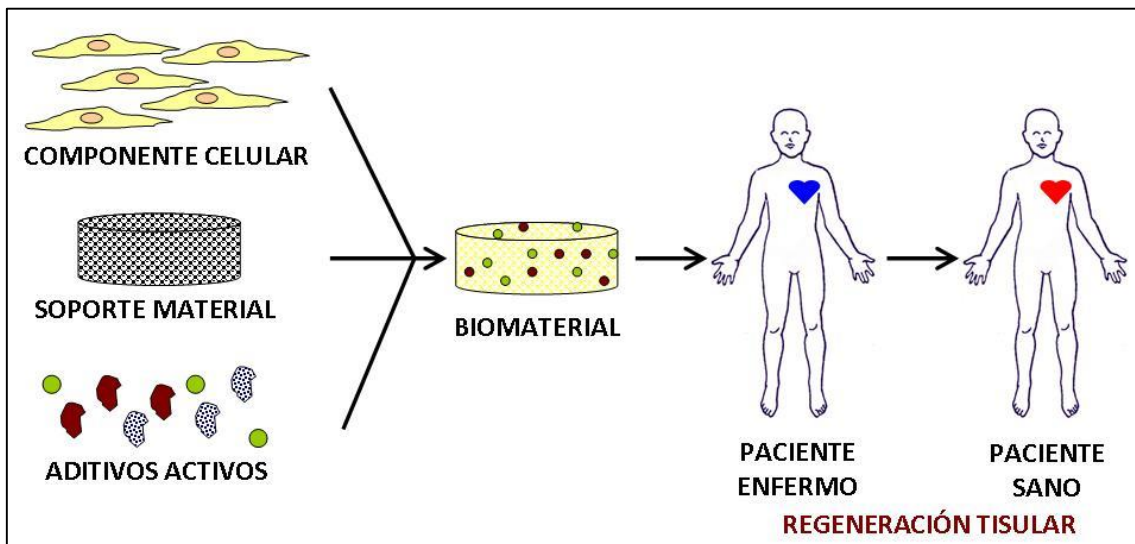


**Figura 2.- Interacciones de la matriz extracelular (MEC) en una célula de tejido conectivo:** La MEC (recuadrada en rojo) es una red tridimensional que se organiza en el exterior celular justamente por encima de la membrana plasmática de la célula. La MEC está formada principalmente por colágeno, laminina, fibronectina e integrina. (Adaptado de Jaalouk *et al.*, 2016).

Dependiendo del tejido, la composición proteica de la matriz varía. Así, en el caso del tejido óseo, la MEC se caracteriza por estar mineralizada gracias a la retención de sustancias minerales que aportan rigidez y estabilidad. Con todo esto, queda

demostrada la importancia de la MEC y su papel en la estabilidad de los tejidos, haciendo de ella una estructura difícil de recrear artificialmente en el laboratorio debido, principalmente, a la falta de tecnologías (Rosales *et al.*, 2016).

Con el objetivo de crear órganos o tejidos lo más parecidos a los fisiológicos, la ingeniería tisular basa sus principios en la combinación de dos componentes fundamentales (Fig.3): un soporte, estructura generalmente tridimensional que trata de cumplir las propiedades de la MEC para que sea capaz de albergar al segundo de los componentes, las células, las cuales se adhieren, proliferan y migran sobre dicho soporte hasta formar un tejido u órgano completo y funcional. Por otro lado, también es precisa normalmente la ayuda de ciertos aditivos biológicos que regulen o induzcan la respuesta celular, como son los factores de crecimiento.



**Figura 3.- Esquema de los principales componentes en los que se basa la ingeniería tisular: Células Soporte y aditivos.** Mediante la combinación de un soporte las células pueden disponer de una base donde crecer y proliferar hasta la formación de un tejido gracias también a la ayuda de aditivos complementarios que sustituyen las biomoléculas involucradas en el desarrollo tisular fisiológico. (Adaptada de *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, 2006).

## CARACTERÍSTICAS DE LOS SOPORTES

Un soporte es la estructura biológica que sirve como andamiaje para la que las células asentadas en él sean capaces de proliferar y diferenciarse hasta formar un tejido completo. El diseño de biomateriales y en especial el de soportes, se utiliza principalmente en terapia génica, terapia inmunológica, terapia con células madre y en ingeniería tisular (Ling *et al.*, 2016).

Uno de los principales retos a los que se enfrenta la ingeniería tisular es la creación de un soporte biológico que se asemeje, en la mayoría de lo posible, al soporte fisiológico por excelencia, la MEC. Teniendo esto en cuenta, el soporte ha de cumplir una serie de características indispensables (O'Brien *et al.*, 2011):

- El mantenimiento de una estructura 3D durante el tiempo de regeneración del tejido.
- El mantenimiento de la permeabilidad para facilitar el flujo de nutrientes, oxígeno y sustancias de desecho de las células.
- Propiedades proangiogénicas, es decir, que el soporte sea capaz de permitir la formación de nuevos vasos sanguíneos para la reorganización del tejido *neoformado*.
- Propiedades biodegradables de tal modo que el soporte pueda degradarse *in vivo* con el tiempo, de manera controlada y progresiva.
- Propiedades biocompatibles, es decir, el soporte no ha de liberar ninguna sustancia tóxica local o sistémico para el organismo.

Existe un amplio abanico en cuanto a tipos de soportes, no obstante, todos ellos pueden agruparse en dos grupos principales: soportes naturales y soportes sintéticos. Los soportes de origen natural están formados generalmente por materiales como ácido hialurónico, gelatinas, heparina o alginato. Estos soportes son buenos candidatos debido a que son biocompatibles y biodegradables además de favorecer la migración y adhesión celular. El otro tipo de soportes, de origen sintético, están formados principalmente por polímeros derivados de los ácidos polilácticos (PLA) y poliglicólico (PGA). Uno de los aspectos positivos de este tipo de biomateriales es la facilidad de manejo y mantenimiento que presentan además de la posibilidad de conseguir producciones a gran escala. Sin embargo, y a diferencia de los soportes naturales, los soportes sintéticos presentan ciertas limitaciones relacionadas con la toxicidad que producen sus componentes a la hora de degradarse (Ling *et al.* 2016), además de resultar normalmente más costosos y menos biocompatibles con las células.

## SOPORTES PARA DEFECTOS ÓSEOS

En el caso del tejido óseo, la MEC se caracteriza, como se ha comentado anteriormente, por su naturaleza rígida y mineralizada y por tanto, un soporte para tejido óseo debería presentar las siguientes características específicas:

- Capacidad osteoconductora, es decir, permitir la adherencia y proliferación de las células fundadoras del hueso, así como la formación de matriz en superficie y poros. Para ello, estos soportes han de ser porosos permitiendo el crecimiento y la distribución de las células a lo largo de todo el soporte lo que favorece una reabsorción y formación de hueso más homogénea (Logeart-Avramoglou *et al.*, 2005).
- Capacidad osteoinductora siendo capaz de inducir la formación de hueso mediante la señalización biomolecular y el reclutamiento de células osteoprogenitoras.
- Poseer propiedades mecánicas similares a las del hueso.

En cuanto al origen de los biomateriales para la regeneración ósea cabe destacar que, generalmente, se utilizan con mayor frecuencia los de origen natural los cuales, están formados, generalmente, por colágeno tipo I, hidroxapatita, ácido hialurónico y alginato. Se ha demostrado que todos ellos cumplen las propiedades de osteoconductividad y osteoinductividad sin embargo, la falta de fuerza mecánica y su rápida degradación hacen que estos materiales, por sí solos, sean unos candidatos limitados (Petrovic *et al.*, 2012). Por otro lado, también se han utilizado soportes óseos de composición muy diversa: cerámicos, fosfato cálcico bifásico, polímeros naturales o sintéticos, componentes metálicos como el titanio, muchas veces combinados con factores osteoinductores como TFG- $\beta$ , BMPs y VEGF (Szpalski *et al.*, 2012).

Entre los tipos de soportes naturales destacamos aquellos formados a partir de hidrogeles combinados con proteínas procedentes de suero autólogo (Ahmed *et al.*, 2008). El suero es la fracción sanguínea resultante tras la eliminación de las proteínas coagulantes de la sangre, y compuesto, principalmente, por albúmina y globulinas. La utilización de proteínas séricas como la albúmina para la creación de biomateriales, especialmente hidrogeles, ha sido una estrategia utilizada previamente en la ingeniería tisular pues una de sus principales ventajas es el carácter autólogo del propio suero, lo que reduce el riesgo al rechazo del injerto (Oss-Ronen *et al.*, 2011). Además, la utilización de hidrogeles en ingeniería tisular cuenta con ventajas como la biocompatibilidad de los mismos, la capacidad de moldearse en diferentes formas ajustables a la anatomía del defecto y la naturaleza porosa que favorece el establecimiento de las células sobre el soporte (Sánchez A. *et al.*, 2007).

El grupo liderado por el Dr. Meana ha desarrollado y patentado un soporte basado en el entrecruzamiento químico de las proteínas del suero sanguíneo con el

Glutaraldehído, el cual ha sido utilizado con éxito para la reparación de defectos óseos críticos en animales (Gallego *et al* 2010; Gallego *et al* 2015). A lo largo de los últimos años la utilización de hidrogeles ha supuesto una estrategia especialmente útil para la generación de soportes sin embargo, estos cuentan con un inconveniente, la ausencia de propiedades mecánicas (Gallego *et al.*, 2015). Esta desventaja se ha de tener en cuenta, especialmente en la creación de soportes óseos ya que, el hueso representa uno de los tejidos con mayor fuerza mecánica del organismo. Por esta razón, se ha hecho hincapié en la búsqueda de materiales que aporten estabilidad a éste soporte óseo.

La fibroína es un compuesto de origen natural procedente de la seda, la cual es obtenida principalmente del gusano *Bombyx mori*. Se trata de un polímero proteico macromolecular biocompatible, con una tasa de degradación perfectamente controlable y con propiedades mecánicas semejantes a las de la matriz ósea (Ahmed *et al.*, 2008). Además, este componente natural favorece la angiogénesis permitiendo un mayor aporte sanguíneo al injerto (Sheykhhasan *et al.*, 2015). Con todo ello, la fibroína forma parte de uno de los componentes estrella a la hora de la creación de soportes para la regeneración ósea además de para la ingeniería tisular en tejidos tales como ligamento, cartílago, tejido epitelial y muscular. (Kasoju *et al.* 2012).

## CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

Además de la necesidad de un soporte que se asemeje a la MEC, la creación del neo-tejido no tendría lugar sin una población celular proliferando y diferenciándose sobre dicho soporte. Por tanto, las células se convierten en el segundo cimiento de la ingeniería tisular (Fig.3).

Las MSCs son células troncales multipotentes, es decir, pueden dar lugar a distintos tipos celulares dentro de una misma línea germinal que en este caso, la correspondiente al mesodermo. Estas células fueron aisladas y cultivadas por primera vez en la década de los sesenta por Friedenstein y colaboradores quienes las denominaron células estromales de médula ósea (Friedenstein *et al.* 1966). Durante sus experimentos consiguieron demostrar, entre otras cosas, la capacidad de las MSCs para diferenciarse hacia células de tejido óseo.

Las MSCs se caracterizan por: su gran adherencia y proliferación en superficies de cultivo, presentar moléculas antigénicas como CD37, CD39 y CD105 y ser capaces de diferenciarse, *in vitro*, hacia condrocitos, adipocitos y osteoblastos (Dominici *et al.*,



2006). Las células mesenquimales, pueden aislarse de diferentes tejidos tales como la médula ósea, cordón umbilical, el tejido adiposo o el tejido muscular esquelético, siendo todas ellas diferentes en morfología e inmunofenotipado (Grayson *et al.*, 2015).

Dentro de los distintos tipos de MSCs las más utilizadas son las células mesenquimales de médula ósea (BMSCs) y las mesenquimales de tejido adiposo (AMSCs). Se ha visto que ambos tipos celulares presentan un gran potencial osteogénico, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que los convierte en candidatos ideales para la reparación de defectos óseos. Por otro lado, también se ha demostrado que existen notables diferencias entre ellas: las AMSCs presentan una menor capacidad osteogénica que las mesenquimales de médula ósea sin embargo, el aislamiento de las AMSCs resulta mucho más accesible y sencillo además de contar con una mayor cantidad de MSCs disponibles comparada con la de médula ósea (Hayashi *et al.*, 2008).

Como se ha dicho anteriormente, los defectos óseos se producen por la no unión de huesos tras una fractura, infección o patologías concretas. En todas ellas, las MSCs pueden llegar a ser, a través de estrategias de ingeniería tisular, una solución muy prometedora. En casos de defectos óseos asociados al cáncer, los defectos óseos podrán resolverse con la introducción de poblaciones sanas de MSCs, con el fin de reanudar y recuperar el metabolismo óseo tras una quimioterapia, radioterapia o cirugía (Grayson *et al.*, 2015). En el caso de defectos óseos asociados a traumatismos graves en huesos largos o huesos del cráneo, la utilización de MSCs está siendo un recurso alternativo para el tratamiento de estos defectos especialmente los relacionados con la no-unión de huesos y el retraso de la regeneración ósea natural (Grayson *et al.*, 2015). Algunos estudios han basado sus ensayos clínicos en la utilización de MSCs procedentes de la cresta iliaca autóloga para la recuperación de defectos óseos en huesos largos como la tibia. En dichos ensayos las MSCs se trasplantaron sobre un soporte basado en una MEC ósea desmineralizada. Con este tratamiento se obtuvieron resultados significativos pues se consiguió recuperar la unión de la fractura mientras que en los grupos control la no-unión ósea seguía siendo aparente (Liebergall *et al.*, 2013).

## HIPÓTESIS

---

Los defectos óseos surgen como consecuencia de una mala ejecución biológica en el proceso de regeneración del hueso tras haber sufrido un traumatismo, infección o haber padecido enfermedades como el cáncer. El trasplante autólogo de tejido óseo, aunque actualmente es considerado el “gold standard” para el tratamiento de estas patologías gracias a su gran osteogenicidad, osteoconductividad y capacidad osteoinductora, es una estrategia con importantes limitaciones. La ingeniería tisular proporciona las herramientas necesarias para desarrollar alternativas eficaces al autoinjerto.

La combinación de fibroína de la seda y suero sanguíneo autólogo permitiría generar un soporte biocompatible y reabsorbible, apto para el crecimiento y proliferación de MSCs de médula ósea, células con gran capacidad osteogénica e inmunomoduladora. La combinación de ambos elementos permitiría obtener un sustituto del auto-injerto que conservara sus principales propiedades, evitando gran parte de sus limitaciones. Dicho sustituto diseñado por ingeniería tisular será utilizado para reparar defectos críticos en el radio de conejos. Si los resultados son positivos, este modelo podría ser trasladado a la clínica en un futuro.

## OBJETIVOS

---

1. Desarrollo de un soporte tridimensional biocompatible, biodegradable, poroso, osteoinductor, osteoconductor y adaptado a la anatomía del defecto, compuesto por fibroína de la seda y proteínas de suero autólogo del animal receptor.
2. Aislamiento, cultivo y expansión *in vitro* de células mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs) de la cresta iliaca autóloga de cada animal receptor.
3. Implante del nuevo soporte de fibroína y proteínas séricas, combinado con BM-MSCs en un modelo de defecto óseo crítico: radio (hueso largo sometido a fuerzas mecánicas y con función de sustento).
4. Seguimiento a partir de la realización de radiografías y estudios macroscópicos y de la microestructura de la evolución del injerto así como del hueso neo-formado en un periodo de 6 meses.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

## **RESULTADOS**

---

## **DISCUSIÓN**

---

## **CONCLUSIONES**

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, Tamer A.E., Emma V. Dare, and Max Hincke. 2008. "Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications." *Tissue Engineering Part B: Reviews* 14 (2): 199–215.
- Badylak, Stephen F. 2005. "Regenerative Medicine and Developmental Biology: The Role of the Extracellular Matrix." *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist* 287B (1). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 36–41.
- Chen, Yan, and Benjamin A. Alman. 2009. "Wnt Pathway, an Essential Role in Bone Regeneration." *Journal of Cellular Biochemistry* 106 (3). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 353–62.
- Cirillo, B, M Morra, and G Catapano. 2004. "Adhesion and Function of Rat Liver Cells Adherent to Silk Fibroin/collagen Blend Films." *The International Journal of Artificial Organs* 27 (1): 60–68.
- Cooper G.M. y R.E. Hausman (2011) *La célula*. 5ª Edición, Marbán.
- Dimitriou, Rozalia, Eleftherios Tsiridis, and Peter V. Giannoudis. 2005. "Current Concepts of Molecular Aspects of Bone Healing." *Injury* 36 (12): 1392–1404.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, and E.M. Horwitz. 2006. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8 (4): 315–17.
- Einhorn, TA, RJ Majeska, and EB Rush. 1995. "The Expression of Cytokine Activity by Fracture Callus." *Journal of Bone and*
- Fang, Qian, Denglong Chen, Zhiming Yang, and Min Li. 2009. "In Vitro and in Vivo Research on Using Antheraea Pernyi Silk Fibroin as Tissue Engineering Tendon Scaffolds." *Materials Science and Engineering: C* 29 (5): 1527–34.
- Friedenstein, A J, I I Piatetzky-Shapiro, and K V Petrakova. 1966. "Osteogenesis in Transplants of Bone Marrow Cells." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 16 (3): 381–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5336210>.
- Fuji, T, T Anada, Y Honda, and Y Shiwaku. 2009. "Octacalcium Phosphate–precipitated Alginate Scaffold for Bone Regeneration." *Engineering Part A*.
- Gallego, Lorena, Luis Junquera, Eva García, Verónica García, María Álvarez-Viejo, Serafín Costilla, Manuel F. Fresno, and Álvaro Meana. 2010. "Repair of Rat Mandibular Bone Defects by Alveolar Osteoblasts in a Novel Plasma-Derived Albumin Scaffold." *Tissue Engineering Part A* 16 (4): 1179–87.
- Gallego, Lorena, Marcos Pérez-Basterrechea, Luis García-Consuegra, María Álvarez-Viejo, Joaquim Megías, Alba Novoa, Serafín Costilla, Álvaro Meana, and Luis Junquera. 2015. "Repair of Segmental Mandibular Bone Defects in Sheep Using Bone Marrow Stromal Cells and Autologous Serum Scaffold: A Pilot Study." *Journal of Clinical Periodontology* 42 (12): 1143–51.

- Gerstenfeld, Louis C., Dennis M. Cullinane, George L. Barnes, Dana T. Graves, and Thomas A. Einhorn. 2003. "Fracture Healing as a Post-Natal Developmental Process: Molecular, Spatial, and Temporal Aspects of Its Regulation." *Journal of Cellular Biochemistry* 88 (5). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 873–84.
- Glimcher, M J. 1987. "The Nature of the Mineral Component of Bone and the Mechanism of Calcification." *Instructional Course Lectures* 36: 49–69.
- Grayson, Warren L., Bruce A. Bunnell, Elizabeth Martin, Trivia Frazier, Ben P. Hung, and Jeffrey M. Gimple. 2015. "Stromal Cells and Stem Cells in Clinical Bone Regeneration." *Nature Reviews Endocrinology* 11 (3). Nature Publishing Group: 140–50.
- Hayashi, Ousuke, Yoshihiro Katsube, Motohiro Hirose, Hajime Ohgushi, and Hiromoto Ito. 2008. "Comparison of Osteogenic Ability of Rat Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Periosteum, and Adipose Tissue." *Calcified Tissue International* 82 (3). Springer-Verlag: 238–47.
- Hutmacher, DW. 2000. "Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage." *Biomaterials*.
- Jaalouk, Diana E., and Jan Lammerding. 2009. "Mechanotransduction Gone Awry." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (1). Nature Publishing Group: 63–73.
- Jin, J, J Wang, J Huang, F Huang, J Fu, and X Yang. 2014. "Transplantation of Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Silk Fibroin/hydroxyapatite Scaffold Improves Bone Repair in Rabbits." *Journal of Bioscience*.
- Kang, SH, YG Chung, IH Oh, YS Kim, and KO Min. 2014. "Bone Regeneration Potential of Allogeneic or Autogeneic Mesenchymal Stem Cells Loaded onto Cancellous Bone Granules in a Rabbit Radial Defect Model." *Cell and Tissue*.
- Kasoju, Naresh, and Utpal Bora. 2012. "Silk Fibroin in Tissue Engineering." *Advanced Healthcare Materials* 1 (4). WILEY-VCH Verlag: 393–412.
- Kasper, G, L Mao, S Geissler, and A Draycheva. 2009. "Insights into Mesenchymal Stem Cell Aging: Involvement of Antioxidant Defense and Actin Cytoskeleton." *Stem*.
- Kim, Youhwan, Hyojin Ko, Ik Keun Kwon, and Kwanwoo Shin. 2016. "Extracellular Matrix Revisited: Roles in Tissue Engineering." *International Neurourology Journal* 20. Korean Continence Society: S23–29.
- Lanyon, LE. 1993. "Osteocytes, Strain Detection, Bone Modeling and Remodeling." *Calcified Tissue International*.
- Li, Ling, Zhi-Yao He, Xia-Wei Wei, and Yu-Quan Wei. 2016. "Recent Advances of Biomaterials in Biotherapy." *Regenerative Biomaterials*.
- Liebergall, Meir, Josh Schroeder, Rami Mosheiff, Zulma Gazit, Zilberman Yoram, Linda Rasooly, Anat Daskal, Amal Houry, Yoram Weil, and Shaul Beyth. 2013. "Stem Cell-based Therapy for Prevention of Delayed Fracture Union: A Randomized and

- Prospective Preliminary Study.” *Molecular Therapy* 21 (8). Nature Publishing Group: 1631–38.
- Lin, Zhonghua, Nancy Y Chiang, Ning Chai, Dhaya Seshasayee, Wyne P Lee, Mercedesz Balazs, Gerald Nakamura, and Lee R Swem. 2014. “In Vivo Antigen-Driven Plasmablast Enrichment in Combination with Antigen-Specific Cell Sorting to Facilitate the Isolation of Rare Monoclonal Antibodies from Human B Cells.” *Nature Protocols* 9 (7). Nature Publishing Group: 1563–77.
- Logeart-Avramoglou, D., F. Anagnostou, R. Bizios, and H. Petite. 2005. “Engineering Bone: Challenges and Obstacles.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9 (1). Blackwell Publishing Ltd: 72–84.
- Marsell, Richard, and Thomas A Einhorn. 2011. “The Biology of Fracture Healing.” *Injury* 42 (6): 551–55.
- O’Brien, Fergal J. 2011. “Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering.” *Materials Today* 14 (3): 88–95.
- Oss-Ronen, Liat, and Dror Seliktar. 2011. “Polymer-Conjugated Albumin and Fibrinogen Composite Hydrogels as Cell Scaffolds Designed for Affinity-Based Drug Delivery.” *Acta Biomaterialia* 7 (1): 163–70.
- Patra, Chinmoy, Sarmistha Talukdar, Tatyana Novoyatleva, Siva R. Velagala, Christian Mühlfeld, Banani Kundu, Subhas C. Kundu, and Felix B. Engel. 2012. “Silk Protein Fibroin from *Antheraea Mylitta* for Cardiac Tissue Engineering.” *Biomaterials* 33 (9): 2673–80.
- Petrovic, Vladimir, Petar Zivkovic, Dragan Petrovic, and Vladisav Stefanovic. 2012. “Craniofacial Bone Tissue Engineering.” *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 114 (3): e1–9.
- Prisell, Per T., D. Edwall, J. B. Lindblad, A. Levinovitz, and G. Norstedt. 1993. “Expression of Insulin-like Growth Factors during Bone Induction in Rat.” *Calcified Tissue International* 53 (3). Springer-Verlag: 201–5.
- Roodman, GD. 1996. “Advances in Bone Biology: The Osteoclast\*.” *Endocrine*
- Rosales, Adrienne M., Kristi S. Anseth, C. M. Nelson, M. J. Bissell, K. S. Midwood, L. V. Williams, J. E. Schwarzbauer, et al. 2016. “The Design of Reversible Hydrogels to Capture Extracellular Matrix Dynamics.” *Nature Reviews Materials* 1 (2): 15012.
- Sánchez, Andrés, María Sibaja B, José Vega-Baudrit, and Sergio Madrigal. 2007. “Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes Planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas.” *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen Iberam. Polim* 8 (84): 241–67.
- Seebach, Caroline, Dirk Henrich, Alexander Schaible, Borna Relja, Manfred Jugold, Halvard Bönig, and Ingo Marzi. 2015. “Cell-Based Therapy by Implanted Human Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Improved Bone Healing of Large Bone Defects in Rats.” *Tissue Engineering. Part A* 21 (9-10): 1565–78.

- Sfeir, Charles, Lawrence Ho, Bruce A. Doll, Kodi Azari, and Jeffrey O. Hollinger. 2005. "Fracture Repair." In *Bone Regeneration and Repair*, 21–44. Totowa, NJ: Humana Press.
- Sheykhasan, Mohsen, Reza Tabatabaei Qomi, and Mahdiah Ghiasi. 2015. "Fibrin Scaffolds Designing in Order to Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiation to Chondrocytes in the Presence of TGF- $\beta$ 3." *International Journal of Stem Cells* 8 (2): 219–27.
- Silberman F.S. y O. Varaona (2010) *Ortopedia y Traumatología*. 3ª Edición, Panamericana.
- Somer, F., Delanghe, J., Somers, P., Debrouwere, M., and Van Nooten, G. 2008 "Mechanical and chemical characteristics of an autologous glue". *Biomed Mater*
- Szpalski, Caroline, Marissa Barbaro, Fabio Sagebin, and Stephen M Warren. 2012. "Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques--Part II: Cell Types." *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 18 (4): 258–69.
- Szpalski, Caroline, Meredith Wetterau, Jason Barr, and Stephen M Warren. 2012. "Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques--Part I: Scaffolds." *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 18 (4): 246–57.
- Tsiridis, Eleftherios, Neil Upadhyay, and Peter Giannoudis. 2007. "Molecular Aspects of Fracture healing: Which Are the Important Molecules?" *Injury* 38 (1): S11–25.
- Weng, Y, M Wang, W Liu, X Hu, and G Chai. 2006. "Repair of Experimental Alveolar Bone Defects by Tissue-Engineered Bone." *Tissue*.
- Yang, Ming-Chia, Shoei-Shen Wang, Nai-Kuan Chou, Nai-Hsin Chi, Yi-You Huang, Yu-Lin Chang, Ming-Jium Shieh, and Tze-Wen Chung. 2009. "The Cardiomyogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells on Silk Fibroin-polysaccharide Cardiac Patches in Vitro." *Biomaterials* 30 (22): 3757–65.
- Zeltinger, J, JK Sherwood, and DA Graham. 2001. "Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition." *Tissue*.
- Zigdon-Giladi, H, A Evron, GM Geller, and U Rudich. 2016. "Recent Advances in Bone Regeneration Using Adult Stem Cells" *World Journal of Stem Cells*