

# Agentes locales en la consolidación ósea: perspectivas para el futuro

E. Gómez-Barrena<sup>a</sup>, L. Orozco-Delclós<sup>b</sup> y L. Munuera-Martínez<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma de Madrid.

<sup>b</sup>Institut de Teràpia Regenerativa Tissular. Centro Médico Teknon. Barcelona.

<sup>c</sup>Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

El amplio desarrollo de la investigación en el campo de la consolidación ósea ha propiciado la existencia de nuevas líneas de investigación que, aunque actualmente no están disponibles para su uso clínico, sí tienen grandes perspectivas de éxito a medio y largo plazo. Entre estas nuevas técnicas destacan los estimuladores locales y matrices inteligentes, las células mesenquimales o la terapia génica. En este artículo se presenta el estado actual de desarrollo de esta tecnología emergente.

**Palabras clave:** PTH, estimuladores locales, células madre, terapia génica, consolidación ósea.

## Local Agents in Bone Healing: Future Perspectives

The outstanding development of research in the field of bone healing has brought about new lines of research into procedures that, although not currently available for clinical use, offer great possibilities of being successful in the medium and long term. Amongst these new techniques, it is worthwhile highlighting local stimulators and smart matrices, mesenchymal cells and gene therapy. In this article we present an update on the development of these emerging technologies.

**Key words:** PTH, local stimulators, stem cells, gene therapy, bone healing.

La gran cantidad de información de la que se dispone actualmente sobre la consolidación de fracturas nos permite ser optimistas sobre el futuro. Algunas de las áreas de investigación que parecen más prometedoras a medio y largo plazo son los estimuladores locales y las matrices inteligentes, el uso de células mesenquimales o la terapia génica.

## ESTIMULADORES LOCALES Y MATRICES INTELIGENTES

Entre los agentes locales en la consolidación ósea se exploran hacia el futuro diferentes sustancias con papel reconocido en la regeneración ósea. En factores de crecimiento con algún desarrollo clínico actual que ya se han presentado, subyace la cuestión no resuelta de las altas dosis de factor requeridas para obtener una eficacia. La respuesta se

desconoce, aunque se manejan hipótesis que van desde la masiva liberación con depleción y consumo en breve plazo, hasta la dificultad para generar el ambiente necesario al administrar un solo factor, pues se requieren múltiples factores que se potencien unos a otros.

Por todo ello, se ha vuelto la mirada a otros agentes interesantes y potencialmente aplicables que influyan de manera más amplia sobre fases cruciales de la regeneración ósea. Entre ellos, destacan la PTH (hormona paratiroidea) y, a nivel local, el VEGF (*vascular endothelial growth factor*) y la PTHrP (*PTH related protein*).

La PTH (como teriparatide) se plantea como la revolución del tratamiento farmacológico de la osteoporosis, y en algunos países ya se considera el único tratamiento aceptable de la misma<sup>1</sup>. También se ha utilizado en múltiples estudios experimentales para aclarar el papel de una administración sistémica sobre la consolidación<sup>2</sup> mediante una temprana estimulación de la proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras, un aumento de producción de proteínas de la matriz ósea y un aumento de la osteoclastogénesis durante la fase de remodelación del callo<sup>3</sup>. Si bien se ha recomendado explorar su uso a baja concentración en caso de fractura, su administración sistémica en pacientes no osteoporóticos

Correspondencia:

E. Gómez Barrena.  
Fundación Jiménez Díaz.  
C/ Avda. Reyes Católicos 2.  
28040 Madrid.

deja abiertas numerosas dudas. Por ello, se justifican ensayos para obtener respuesta local de otros agentes.

El VEGF es un potente estimulador de la angiogénesis<sup>4</sup> que actúa a través de receptores específicos de membrana de tipo tirosina quinasa (VEGFR1 y VEGFR2) y del receptor complementario neurofilina. El VEGF y sus receptores se han localizado en las células óseas (osteoblastos y osteoclastos, y hasta condrocitos en proceso de osificación endocranal), pero su función en el hueso no está suficientemente caracterizada, aunque se sabe que la angiogénesis dependiente del VEGF es esencial para el acoplamiento de la resorción del cartílago con la formación y el remodelado del hueso endocranal<sup>5</sup>. Pese al insuficiente conocimiento actual, el interés por la estimulación de la angiogénesis, tan necesaria para el desarrollo de hueso en el defecto y la consolidación de la fractura, ha propiciado diferentes ensayos experimentales para estimular el relleno de un defecto óseo merced al aporte de VEGF<sup>6,7</sup>.

Como el VEGF, la PTHrP es un péptido producido por las células óseas. De manera amplia, se considera una citoquina expresada en la mayoría de los tejidos normales, por supuesto incluido el hueso<sup>8</sup>. La PTHrP es un regulador autoparacrino del crecimiento y la diferenciación celular en muchos de estos tejidos, y en la actualidad se considera un importante regulador del metabolismo óseo<sup>8,9</sup>. Esta proteína se expresa tanto en los condrocitos como en los osteoblastos durante el desarrollo del hueso, lo que indica un importante papel en la formación del hueso endocranal<sup>8</sup>. De hecho, la supresión homocigótica de los genes de la PTHrP y del receptor tipo I común para PTH y PTHrP (PTH1R) genera una condrodisplasia letal perinatal en el ratón<sup>8,9</sup>. Ahí entronca, a nivel local, con las conocidas acciones de la PTH a nivel sistémico, siendo que comparten receptor.

Los mecanismos de la acción anabólica ósea de la PTH y la PTHrP *in vivo* parecen complejos e implican la interacción con factores osteogénicos locales (como el IGF-I) en la proliferación y diferenciación de la línea osteoprogenitora, y con los mecanismos de apoptosis osteoblástica. Así, la PTH puede actuar como protector frente a la apoptosis tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de genes de supervivencia de la familia de Bcl-2 y del factor de transcripción Cbfa1/Runx2 en los osteoblastos<sup>10</sup>. La expresión del VEGF y de la PTHrP, así como de sus receptores, varían con la diferenciación osteoblástica, dado que la osteogénesis y la angiogénesis ocurren de manera coordinada durante el remodelado óseo. Por tanto, lejos de acciones puntuales de un factor de crecimiento, se plantean para el futuro estrategias que potencien la línea celular osteoformadora, en la que participan los agentes mencionados.

Sin embargo, el manejo local de sustancias como las señaladas se enfrenta a las barreras ya observadas en la aplicación de factores de crecimiento a la fractura o el defecto: necesidad de grandes cantidades de péptido y gran liberación inicial. Por ello, una vez identificada la estrategia bio-

lógica a utilizar, su transporte y adecuada distribución en el foco de consolidación puede llevar a su éxito o a su fracaso.

A partir de este planteamiento, la suma de agentes osteoinductivos a una matriz osteoconductiva ha sido contemplada experimentalmente en los últimos años como estrategia futura. Dado que un problema significativo para tener éxito es la limitada acción de los agentes osteoinductivos en caso de rápida liberación y metabolización, se está progresando también en el control de dicha liberación. El objetivo de obtener una matriz capaz de liberar el péptido alojado, en respuesta a cambios en el medio, aumentaría la biodisponibilidad de la sustancia en el entorno y en el momento que se precise, con lo que el material capaz de esto tendría una interesante adaptación a las necesidades del entorno, y se ha venido a considerar «biomaterial inteligente» en una nueva generación de biomateriales cuyas propiedades pueden regularse y cambiar a petición (*Nanotechnology and Smart Materials for Medical Applications*, Noviembre 29-30, 2004, Roma).

Las estrategias vigentes incluyen el uso de materiales transportadores desde poliméricos (inertes y reabsorbibles) a biocerámicos, pasando por el frecuentemente utilizado colágeno. El diseño de matrices inteligentes entraña gran dificultad, pero se están explorando las posibilidades que ofrecen los cambios detectables en el medio de consolidación (pH, pO<sub>2</sub>, etc.) y las posibles estrategias de liberación controlada (funcionalización de los poros, bloqueo y desbloqueo, etc.). Si todo ello se consigue sobre un material bioactivo, puede llegar un material verdaderamente osteoinductor, capaz de guiar la osteogénesis de modo predecible.

## REGENERACIÓN ÓSEA CON CÉLULAS MESENQUIMALES: ENSAYOS CLÍNICOS

La médula ósea (MO) contiene células en estado quiescente que, ante determinadas señales biológicas, poseen la capacidad de proliferar, diferenciarse e inducir la regeneración del sistema hematopoyético, inmunológico o los tejidos óseo y vascular. No obstante, en determinadas situaciones patológicas, el organismo es incapaz de movilizar un número suficiente de estas células progenitoras necesarias para lograr la regeneración<sup>11-13</sup>. En casos como los fracasos de consolidación ósea podría plantearse lograr el restablecimiento de la capacidad regenerativa recolectando MO mediante punción-aspiración del hueso ilíaco y aplicándola en el foco de la lesión. No obstante, la principal limitación del uso de MO no procesada es la dificultad de obtener con ella una cantidad de células progenitoras suficiente para conseguir una respuesta regenerativa (1 célula mesenquimal por cada 10.000-100.000 células nucleadas de MO). Estudios de dosis/eficacia estiman que para la resolución de la mayoría de situaciones patológicas graves se precisaría una aportación mínima de 1 litro de MO.

En cirugía ortopédica y traumatológica el tratamiento mediante autoinjerto óseo esponjoso, considerado el «patrón oro», que procura la aportación de células progenitoras y señales inductoras en un soporte osteoconductor teóricamente ideal, también presenta los inconvenientes de la inevitable yatrogenia que implica su obtención<sup>14</sup> y su limitado contenido en células progenitoras, razones que actualmente se esgrimen a favor de su sustitución por el empleo de aloinjertos (acelulares) o biomateriales, ambos aplicados de forma aislada o conjuntados con productos osteoinductores o incluso MO obtenida por aspirado.

Astrom Biosciences (AnnArbor, Michigan, EE.UU.) ha desarrollado un biorreactor (*Astrom Replicell System*<sup>®</sup> [ARS]) que, cumpliendo normas GMP, permite la expansión *ex vivo* de células multipotenciales (con capacidad de diferenciación multilínea) a partir del aspirado de un pequeño volumen (50-80 ml) de MO de cresta ilíaca autóloga, producto celular denominado *Tissue Repair Cells* o TRC.

El cultivo en el ARS durante 12 días se realiza a tasas específicas de oxigenación e intercambio de medio que determinan la expansión selectiva de células progenitoras. Esta tecnología de perfusión continua (*Single Pass Perfusion*), que renueva continua y lentamente el medio de cultivo celular, ha demostrado mediante citometría de flujo, ensayos clonogénicos y baterías de genes selectivas, que enriquece la población de células progenitoras de linaje endotelial y mesenquimal al tiempo que reduce la presencia de células diferenciadas. El aumento de la presencia de células progenitoras que expresan marcadores Thy1+/CD14- se correlaciona de forma exponencial con la formación ósea<sup>17,18</sup> (tabla 1).

Este producto celular es rico en células adherentes que crecen formando una matriz extracelular (estroma) propicio al crecimiento de los diferentes linajes progenitores y que

liberan señales relacionadas con la angiogénesis y la formación de tejido óseo. Se considera que el tejido lesionado tratado con TRC utiliza estas células progenitoras como parte de un proceso natural de reparación y regeneración tisular, funcionalmente similar a lo que ocurriría al aplicar un gran volumen de médula ósea propia. Entre otras aplicaciones potenciales que se están estudiando con el empleo de esta biotecnología se incluyen la reconstitución hematopoyética, la regeneración ósea y la vascular periférica y cardíaca<sup>19,20</sup>.

En el ámbito de la terapia celular somática en humanos, las TRC ya han demostrado su capacidad como facilitadoras de injerto y regeneración hemopoyética de forma reproducible y fiable. La viabilidad y seguridad del método se ha evidenciado en diversos ensayos clínicos multicéntricos multinacionales (EE.UU. y UE) desarrollados desde 1995.

Las TRC administradas por infusión sistémica en más de 140 pacientes afectados por cáncer de mama o linfoma que requerían trasplante de médula ósea después de terapias mieloablativas o mielotóxicas, evidenciaron una respuesta de injerto idéntica a los que recibieron un trasplante tradicional de gran cantidad de médula ósea. Debe resaltarse que el sistema no produce la expansión de células tumorales, y aún más, en estos pacientes afectados de cáncer produjo la eliminación (*purging*) de las células tumorales quiescentes en la muestra de MO recolectada.

Nuestro grupo de trabajo (ITRT-Dr. Orozco), en funciones de I+D+I, participa junto con otras entidades en diversos ensayos clínicos que contemplan la aplicación de TRC en regeneración de tejido óseo. Iniciamos los estudios en el año 2003 con dos pilotos, sometidos al control de la OCAT (Organización Catalana de Transplantes), para evaluar viabilidad y seguridad de las TRC en pseudoartrosis no hipertróficas de huesos largos y regeneración de maxilar atrófico en casos de edentulismo. Los datos obtenidos en estos estudios también fueron muy satisfactorios respecto a la eficacia, ya que se logró la curación de los 6 casos de pseudoartrosis evocando un modelo *per primam* y en un tiempo medio de 4 meses. La histomorfometría en las intervenciones sobre el maxilar mostraron un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) de la altura ósea en la zona injertada con TRC frente a la arcada contralateral no injertada (control).

Con motivo de la ley promulgada en mayo del 2004 relativa al uso de células manipuladas, que considera como un medicamento los productos celulares como las TRC, se detuvo la puesta en marcha de nuevos estudios y llevamos a cabo el procedimiento de solicitud de autorización a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios para permitir la aplicación de las TRC como un «Producto en Investigación» (PEI). La autorización fue concedida en noviembre del 2005. A partir de esta fecha se ha proseguido con los estudios referentes a pseudoartrosis que sumarán datos con otros similares llevados a cabo en EE.UU. y Alemania, y se iniciaron los procedimientos de otros dos protocolos de aplicación en artrodesis vertebral y en osteonecrosis

**Tabla 1.** Fenotipo de las *Tissue Repair Cells* (TRC) por citometría de flujo

	MNC de MO	TRC	
CFU-GM		0,6%	
CD34+lin-	0,7%	0,6%	
Myeloid (CD15, CD11b)	3,7%	68%	Hematopoyesis
Erythroid (GlyA)	49%	0,7%	Sangre
CD14+	14%	38%	
	7%		
CFU-F		3,6%	
Thy1+/CD14-	0,01%	21%	
CD105+/166+/14-/45-	0,2%	13%	Mesenquimales
	0,07%		Hueso, etc.
CD133/KDR+		3%	
vWF+	0,2%	58%	
CD144+	16%	39%	Endoteliales
CD146+	15%	17%	Vasos
CD144+/146+	0,8%	4%	
	0,1%		

MNC de MO: células mononucleares de médula ósea.  
Tomada de: Astrom Biosciences.

de la cabeza del fémur que consideramos de máximo interés, como así lo entiende la *Food and Drug Administration* (FDA) al considerar las TRC como «medicamento huérfano» para el tratamiento de la osteonecrosis.

En esquema, la metodología de obtención-aplicación de las TRC común a todos los estudios es:

- 1) Obtención de MO bajo sedación-anestesia local (aproximadamente 60 ml).
- 2) Transporte de la MO a la Unidad de Terapia Celular del *Banc de Sang i Teixits* del *Servei Català de Salut* (BST).
- 3) Selección de células mononucleares (Ficoll).
- 4) Inoculación en la biocámara de  $300 \times 10^6$  células mononucleares.
- 5) Cultivo en el biorreactor ARS durante 12 días.
- 6) Recolección, caracterización y análisis de seguridad del producto TRC final.
- 7) Transporte de las TRC al centro quirúrgico.
- 8) Intervención quirúrgica según la norma durante la que se elabora y aplica un bioinjerto constituido por una dosis de TRC y fosfato tricálcico (PTC) en proporción de volumen 1:1, compactándose el conjunto con un volumen similar de plasma pobre en plaquetas (PPP).

Una unidad —dosis— de TRC contiene aproximadamente  $132 \times 10^6$  células viables de médula ósea ( $132 \pm 85 \times 10^6$  células con un margen de confianza del 95%, en un intervalo comprendido entre un mínimo de  $56 \times 10^6$  células hasta un máximo de  $203 \times 10^6$  células). El estado actual de los ensayos clínicos que se están realizando sobre regeneración ósea con TRC aparecen en la tabla 2.

## GENOMA Y TERAPIA GÉNICA

Los avances en genética molecular de las últimas décadas están llevando a cabo una revolución en el conocimiento de los complejos procesos de la biología y en los mecanismos íntimos de muchas enfermedades y, en consecuencia, empiezan a tener esperanzadas repercusiones en la medicina clínica. Hace casi dos décadas se puso en marcha el Proyecto Genoma, con objeto de conocer la secuencia molecular del complemento cromosómico humano e identificar todos los genes implicados en las enfermedades, especialmente el cáncer. Así se podrá definir su fisiopatología a nivel celular y molecular para introducir nuevos y refinados procedimientos de predicción, prevención, diagnóstico y tratamiento. El proyecto inició su andadura oficial en 1988 copatrocinado por tres instituciones oficiales de Estados Unidos y diversas organizaciones científicas de todo el mundo. Los objetivos inicialmente trazados para 5 años se han ido alcanzando antes de lo previsto, incluyendo algunas afecciones del aparato locomotor relacionadas con defectos genéticos<sup>21</sup>.

Tal es el caso de enfermedades regidas por las leyes de Mendel, en las que se han identificado los genes cuyas mutaciones causan la afección. Así ha ocurrido con la osteogé-

nesis imperfecta (codificación de la colágena I)<sup>22</sup>, la fibrodisplasia osificante progresiva (síntesis o señalización de la BMP-4)<sup>23</sup>, los trastornos de almacenamiento lisosómico como la enfermedad de Gaucher (mutación del gen de la glucocerebrosidasa), y las mucopolisacaridosis tipo Hunter y Hurler (defectos enzimáticos que dificultan la rotura de los glucosaminoglicanos)<sup>26</sup>. Los esfuerzos de las investigaciones actuales se basan en sustituir o compensar el gen mutante con el gen normal mediante tecnología recombinante (transgénesis). Es evidente que sería necesario llevar a cabo esta modificación en fases iniciales del desarrollo, preferiblemente *in útero*, anticipándose a la estructuración de las alteraciones de los tejidos. Además, es importante mantener largo tiempo la expresión transgénica o mantenerla periódicamente.

Algunas enfermedades de transmisión no mendeliana tienen gran trascendencia por su prevalencia y consecuencias clínicas, sociales y económicas. Entre ellas están nada menos que la artritis reumatoide, la osteoporosis y la artrosis. Dado que sus bases genéticas no están bien precisadas, los objetivos terapéuticos se dirigen a actuar sobre los mediadores moleculares que participan en sus mecanismos fisiopatológicos. Por ejemplo, se han estudiado los genes que codifican varios mediadores de la inflamación, como ciertas interleuquinas y el factor de necrosis tumoral para la primera<sup>25</sup> y los que expresan la osteoprotegerina, molécula participante en la remodelación ósea para la segunda<sup>27</sup>. Los conocimientos de ambas han propiciado investigaciones en modelos animales para modificar tanto las citoquinas proinflamatorias implicadas en la reacción tisular a las partículas de desgaste, como las que participan en la osteólisis, consecuencia de la misma<sup>26</sup>. En cuanto a la artrosis, el ADN complementario de la interleuquina II-1Ra podría ser efectivo como condroprotector<sup>28</sup>. Los hallazgos descritos han conducido a numerosos estudios experimentales de orientación terapéutica que se han traducido ya en algunos ensayos clínicos para la artritis reumatoide<sup>25,29</sup>. Dada la ausencia de modelos preclínicos adecuados para la investigación de los sarcomas del aparato locomotor (cultivos celulares, lesiones espontáneas en animales, modelos xenogénicos como el ratón desnudo, etc.) los avances han sido limitados.

Como se ha visto, la información obtenida en estudios sobre genoma humano ha conducido al mejor conocimiento de la fisiopatología de un buen número de enfermedades del aparato locomotor, y de manera inmediata al propósito de modificar o curar enfermedades sistémicas mediante la transferencia de los genes apropiados. En esto consiste la llamada terapia génica de la que se ofrecen dos modalidades. La terapia llamada de la línea germinal, que inició este nuevo y esperanzador campo, corresponde a aquellos ejemplos referidos más arriba en los que se pretende modificar la dotación genética con carácter permanente y transmisible a la descendencia. La llamada terapia de las células somáticas se puede considerar similar al trasplante de células o tejidos,

**Tabla 2.** Estado de los ensayos en curso sobre regeneración ósea con *Tissue Repair Cells* (TRC) (abril 2005)

Ensayo clínico	Descripción	Resultados
Seguridad y efectividad de las TRC para regeneración ósea en pseudoartrosis de huesos largos (en curso)	— Bajo control FDA IND — Fase I/II. Inicio 08/2003 — N = 36  Centros 3 centros en EE.UU.	— 27 pacientes siguieron durante 6-52 semanas, sigue el reclutamiento de pacientes. — Ninguna reacción adversa relacionada con las TRC Formación de puentes óseos visualizados radiográficamente en 9/17 (53%) a 3 meses; 11/12 (92%) a 6 meses; 5/6 (83%) a 9 meses; 3/3 (100%) a un año tras terapia
Seguridad y efectividad de las TRC para regeneración ósea en pseudoartrosis no hipertróficas de huesos largos (En curso: Vigilancia de seguridad a 24 meses)	— Bajo control OCAT (ONT) y homologable FDA — Fase I/II. Inicio 02/2004 — N = 6 Centros — Hospital Gral. l'Hospitalet — Centro Médico Teknon — Hosp. Barcelona-SCIAS (colab. de Mutua Universal)	— 6 pseudoartrosis (5 pacientes) tratados. — Ninguna reacción adversa relacionada con las TRC — 6 pseudoartrosis consolidadas en un tiempo máximo de 6 meses a partir del tratamiento
Seguridad y efectividad de las TRC para generar hueso en pacientes que requieran aumentar la altura del seno maxilar (En curso: Vigilancia de seguridad a 24 meses)	— Bajo control OCAT (ONT) y homologable FDA — Fase I/II; Inicio 04/2004 — N = 5 — Tratamiento bilateral con TRC + PTC + PPP en un maxilar, y PTC + PPP en contralateral Centro — Centro Médico Teknon Inst. Cirugía Maxilofacial Federico. Hdez. Alfaro.	— 5 pacientes tratados (4 fumadores crónicos) — Ninguna reacción adversa relacionada con las TRC — A 4 meses, TRC frente a control mostraron un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) de la altura ósea en la zona del injerto; histomorfometría: mayor formación e integración ósea
Seguridad y efectividad de las TRC para generar la reparación ósea en pacientes pseudoartrosis no hipertróficas de huesos largos (en curso)	— Fase I/II; Inicio 3/2004 — N = 10 Centro — Hospital de Bochum, Alemania	— 3 pacientes tratados. Sigue el reclutamiento de pacientes — Ninguna reacción adversa relacionada con las TRC 2 pacientes no recibieron células debido a un error de procedimiento
Seguridad y efectividad de las TRC para regeneración ósea en pseudoartrosis de huesos largos. (en curso)	— Bajo control AEMPS y homologable FDA — Fase I/II; Inicio 11/2005 — N = 10 Centros — Centro Médico Teknon — Hospital Gral. l'Hospitalet — Hosp. Barcelona-SCIAS (col. de Mutua Universal)	— 5 pacientes tratados desde 12/05. (fecha actual 4/06) Sigue el reclutamiento de pacientes — Ninguna reacción adversa relacionada con las TRC — Formación de puentes óseos visualizados radiográficamente en 1/2 (50%) a 4 meses
Seguridad y efectividad de las TRC en artrodesis vertebral	— Bajo control AEMPS y homologable FDA — Fase I/II; Inicio 5/2006 — N = 10 Centros — Centro Médico Teknon — Hospital Trias i Pujol	Aprobado AEMPS Pendiente inicio reclutamiento de pacientes
Eficacia de las TRC en la terapia de la osteonecrosis de la cabeza femoral	— Bajo control AEMPS y homologable FDA — Fase III — N = 50 (iniciales) Centros — Centro Médico Teknon — Instituto Ortopédico Universidad König-Ludwig-Haus Julius-Maximilians de Würzburg + previstos — 3 centros España — 4 centros Alemania — 5 centros EE.UU.	Aprobado CEIC Pendiente aprobación AEMPS TRC declarado medicamento huérfano por FDA para tratamiento de osteonecrosis

PTC: fosfato tricálcico; PPT: plasma pobre en plaquetas; TRC: *tissue repair cells* (células de reparación tisular).

sin las repercusiones generales anteriores, ya que permite el aporte local de proteínas, factores locales, citoquinas y morfógenos habitualmente implicados en la regeneración tisular. Estos factores constituyen, junto con las células y las matrices o andamiajes conductores, uno de los tres componentes de la ingeniería de tejidos. Pero en ésta la molécula recombinante elegida es directamente aplicada en el lugar tratado, mientras que la terapia génica local acelera o induce el proceso fisiológico por expresión natural de la molécula implicada<sup>30</sup>.

## TERAPIA GÉNICA PARA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN ÓSEA

La reparación ósea viene siendo satisfactoriamente resuelta en la mayoría de los casos gracias a la llamada bioingeniería estructural, basada en implantes e instrumentos para sustituir tejidos alterados o estabilizar elementos lesionados facilitando su curación. Pero la bioingeniería estructural se ha mostrado insuficiente para reparar defectos o daños graves y extensos asociados a fibrosis, insuficiente vascularización y escasa disponibilidad de células precursoras osteogénicas. Éstos requieren la regeneración de tejido óseo vivo capaz de responder eficazmente a los estímulos mecánicos y biológicos<sup>31</sup>. Como se describe en otro lugar, se vienen aplicando en la práctica clínica un buen número de factores con probada capacidad de inducir la diferenciación de las células mesenquimales a la función osteogénica. Aunque los ensayos clínicos previos para indicaciones específicas y limitadas de las BMP han sido rigurosamente científicos<sup>33</sup>, sus prometedoras perspectivas están por demostrar. En efecto, los resultados son en ocasiones imprevisibles, ya que se requieren concentraciones muy altas en una dosis única para lograr efectividad. Existen dudas sobre la idoneidad de los materiales portadores, la estabilidad y degradación de estas moléculas una vez introducidas y, por tanto, sobre la duración de su efecto. Pero, sobre todo, parece paradójico que se pretendan ofrecer soluciones biológicas que están muy lejos de respetar las secuencias espaciales y temporales y las características íntimas de los procesos que regulan la regeneración y la reparación ósea. Caplan<sup>34</sup> enunció en los albores de la ingeniería tisular del aparato locomotor un principio fundamental para su correcta realización: debería reproducirse la completa recapitulación de los acontecimientos que se producen durante la embriogénesis de los miembros para una adecuada regeneración de órganos y tejidos. La consolidación de las fracturas es un complejo y sofisticado proceso similar, en el que intervienen una serie de moléculas portadoras de mensajes celulares programadas en una secuencia temporal bien definida para restablecer la estructura y la función del segmento lesionado<sup>32</sup>. Inmediatamente después de la fractura en el hematoma se concentran factores como PDGF, TGF $\beta$ , IGFs y FGF2 procedentes de plaquetas y células que partici-

pan en la respuesta inflamatoria postraumática como polimorfonucleares y macrófagos activados que internalizan partículas y detritos. Rápidamente se produce el reclutamiento y proliferación de un blastema de células mesenquimales primitivas en cuya formación intervienen los factores mencionados gracias a su capacidad mitogénica. Mientras éstos están precoz y ampliamente distribuidos en el callo blando, los factores propiamente osteoinductores, como las BMP, aparecen más tardíamente. La acción conjunta de TGF $\beta$ , FGF2 y BMP induce la diferenciación de las células precursoras presentes a condroblastos, para la osificación endocondral en algunas áreas, y a osteoblastos. Como ejemplo de la complejidad y sutileza de las interacciones de los factores de crecimiento entre sí y con las células, se ha demostrado que la expresión en el foco de la BMP2 es mayor en la fase inflamatoria inicial, mientras en las fases condrogénicas y osteogénicas predominan las BMP 3, 4, 7 y 8<sup>35</sup>. En resumen:

1) Los múltiples factores de crecimiento que intervienen tanto durante el desarrollo del esqueleto como durante la consolidación de las fracturas actúan coordinadamente.

2) Estos factores actúan de manera secuencial: genes tipo *hox* establecen el patrón desde el inicio, los factores mitogénicos promueven la proliferación celular y la angiogénesis y los factores inductores facilitan finalmente la diferenciación.

3) Algunos de estos factores cooperan entre sí para regular los procesos o para formar complejos diméricos (BMP 2, 4, 7)<sup>30</sup> que se solapan en el tiempo.

Es evidente que la aplicación de los factores de crecimiento, tal y como se practica actualmente, dista mucho, por su rudeza y simplismo, de las condiciones que la naturaleza ha previsto para uno de los procesos más refinados de la reparación tisular.

La terapia génica local pretende desarrollar sistemas que permitan controlar la acción de los factores y el ritmo y concentraciones de su liberación, así como facilitar las poblaciones de células diana. Tras haber completado el genoma humano se poseen los datos de secuenciación de todos los factores conocidos, lo que permite la transferencia del gen adecuado a numerosos tipos de células, incluyendo las troncales y las precursoras osteogénicas. La introducción del germen en el organismo puede realizarse mediante aplicación directa en el tejido a tratar para incorporarse a las células locales (transducción *in vivo*). El transporte del gen se realiza sobre vectores virales y no virales. Entre los primeros, los más frecuentemente utilizados son los adenovirus y ocasionalmente otros como los retrovirus, virus adeno-asociados y lentivirus. Entre los vehículos no virales se encuentran polímeros, lípidos, péptidos y plásmidos. En la transducción *ex vivo* el gen es introducido en células cultivadas obtenidas del paciente, para evitar la posibilidad de rechazo y ser luego transplantadas al paciente. En la primera modalidad se evitan las molestias y complicaciones relacionadas con la extracción de las muestras celulares, pero el tipo y el

número de las células modificadas es imprevisible y pueden aparecer reacciones agudas frente a las proteínas inmunogénicas de los cápsidos en los vectores virales. Los vectores no virales son notablemente menos eficaces, aunque resultan más baratos y fáciles de aplicar. En cuanto a la terapia génica *ex vivo*, tanto la transducción en cultivo como la implantación sobre una matriz o andamiaje natural o artificial pueden realizarse de manera precisa y controlada<sup>24</sup>. Si el factor codificado por el gen utilizado es soluble, su liberación tendrá efectos autocrinos (sobre la misma célula portadora) o paracrinos (sobre las células vecinas). Si el sitio de acción de la proteína codificada es intracelular (receptores superficiales, factores de transcripción) sólo en ella se producirán sus efectos.

La finalización del Proyecto Genoma Humano ha conducido a investigaciones para aplicaciones terapéuticas del conocimiento derivado de él. Así ha nacido la terapia génica, rama de la «bioingeniería biológica»<sup>31</sup>. Aunque su desarrollo se mantiene todavía en los límites experimentales, se han despertado grandes esperanzas de aplicaciones clínicas para situaciones que no tienen respuesta eficaz actualmente, aunque en un horizonte temporal todavía difícil de precisar. La terapia génica del aparato locomotor se basa en principios científicos sólidos ya que intenta mimetizar los sucesos de manera fisiológica y podrá llegar allí donde la «bioingeniería estructural no alcanza». El camino a recorrer pasa por profundizar en el conocimiento de los mecanismos biológicos a nivel tisular, celular y molecular. Es preciso progresar en el diseño y fabricación de vectores y matrices portadoras. El desarrollo de células con refuerzo de la expresión de las proteínas deseadas que puedan ser sembradas en las matrices apropiadas es una orientación reciente y prometedora<sup>26</sup>. Son imprescindibles estudios clínicos bien controlados en la relación seguridad-eficacia-coste antes de proceder a su utilización generalizada. El potencial comercial presente en estas tecnologías ha movilizado grandes inversiones de un sector, el industrial, cuyos sus objetivos pueden no coincidir con los de clínicos, investigadores y pacientes<sup>36</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cosman F. Anabolic therapy for osteoporosis: parathyroid hormone. *Curr Osteoporos Rep.* 2005;3:143-9.
2. Alkhiary YM, Gerstenfeld LC, Krall E, Westmore M, Sato M, Mitlak BH et al. Enhancement of experimental fracture-healing by systemic administration of recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34). *J Bone Joint Surg Am.* 2005; 87A:731-41.
3. Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA, et al. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res.* 2002;17:2038-47.
4. Murota SI, Onodera M, Morita I. Regulation of angiogenesis by controlling VEGF receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 902:208-12.
5. Alagiakrishnan K, Juby A, Hanley D, Tymchak W, Sclater A. Role of vascular factors in osteoporosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003;58:362-6.
6. Murphy WL, Peters MC, Kohn DH, Money DJ. Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly (lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 2000;21:2521-7.
7. Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(B):1434-8.
8. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev.* 1996; 76:127-73.
9. Strewler GJ. The physiology of parathyroid hormone-related protein. *N Engl J Med.* 2000;342:177-85.
10. Martínez P, Esbrit P, Rodrigo A, Álvarez-Arroyo MV, Martínez ME. Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *Osteoporos Int.* 2002;13:874-81.
11. Bruder S, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem.* 1994;56:283-94.
12. Körbling M, Estrov Z. Adult Stem Cells for Tissue Repair. A New Therapeutic Concept?. *N Engl J Med.* 2003;349:570-82.
13. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. None Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromol Biosc.* 2004;4:743-65.
14. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine.* 1995;20:1055-60.
15. Koller MR, Palsson MA, Manchel I, Maher RJ, Palsson BO. Tissue culture surface characteristics influence the expansion of human bone marrow cells. *Biomaterials.* 1998;19: 1963-72.
16. Lundell BI, Mandalam RK, Smith AK. Clinical scale expansion of cryopreserved small volume whole bone marrow aspirates produces sufficient cells for clinical use. *J Hematother.* 1999;8:115-27.
17. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1998;16:155-62.
18. Endres M, Hutmacher DW, Salgado AJ, Kaps C, Ringe J, Reis RL. Osteogenic Induction of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells in Novel Synthetic Polymer-Hydrogel Matrices. *Tissue Eng.* 2003;9:689-702.
19. Cato T, Frank KKO, et al. Studies on the development of a tissue engineered matrix for bone regeneration. *Cells and Materials.* 1998;8:175-81.
20. Bachier CR, Gokmen E, Teale J, Lanzkron S, Childs C, Franklin W. Ex-vivo expansion of bone marrow progenitor cells for hematopoietic reconstitution following high-dose chemotherapy for breast cancer. *Exp Hematol.* 1999;27:615-23.
21. Jaffurs D, Evans CH. The human genome project: implications for the treatment musculoskeletal disease. *J Am Acad Orthop Surg.* 1998;6:1-14.
22. Niyibizi C, Mi Z, Robbins PD. Potential gene therapy for diseases of bone. En: Rosier RN, Evans CH, directores. *Molecular Biology in Orthopedics.* Rosemont Illinois: AAOS; 2001. p. 67-374.
23. Kaplan FS, Ahn J, Serrano de la Peña L. Fibrodysplasia ossificans progressive: deciphering the molecular pathways of ectopic skeletogenesis. En: Rosier RN, Evans CH, directores.

- Molecular Biology in Orthopedics. Rosemont Illinois: AAOS; 2001. p. 5-105.
24. Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC. Possible orthopedic applications of gene therapy. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(A):1103-14.
  25. Evans CH, Ghivizzani SC, Herndon JH. Clinical trials in the gene therapy of arthritis. *Clin Orthop.* 2000;379:S300-7.
  26. Evans CH, Ghivizzani SC, Herndon J, Robbins PD. Terapia génica para el tratamiento de las enfermedades musculoesqueléticas. *J Am Acad Orthop Surg (ed Esp).* 2005;4:302-4.
  27. Kostenuik PJ, Bolton B, Morony S, Daris M, Genz Z, Carter C, et al. Gene therapy with human recombinant osteoprotegerin reverses established osteopenia in ovariectomized mice. *Bone.* 2004;34:656-64.
  28. Mc Ilwraith CW, Frisbie DD. Break out session: Osteoarthritis. *Clin Orthop.* 2000;379:S311.
  29. Bandara G, Robbins PD, Georescu HO, Mueller GM, Glorioso JC, Evans CH. Gene transfer to synoviocytes. Prospects for gene treatment of arthritis. *DNA Cell Biol.* 1992;11:227-331.
  30. Franceschi RT. Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. *J Dent Res.* 2005;84:1093-103.
  31. Buckwalter JA. Can tissue engineering help orthopedic patients? Clinical needs and criteria for success. En: Sandell LJ, Grodzinsky AJ, editores. *Tissue Engineering in Musculoskeletal Clinical Practice.* Rosemont Illinois: AAOS; 2004. p. 16.
  32. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop.* 1998;355:7-21.
  33. Einhorn TA. Clinical applications of human recombinant BMPs: early experiences and future developments. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85(A) Suppl 3:82-8.
  34. Caplan AI, Goldberg VM. Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop.* 1999;367S: S12-6.
  35. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002;17:513-20.
  36. Lieberman JR. Breakout Session 3: Fracture healing and other non genetic diseases of bone. *Clin Orthop.* 2000;379S: S156-8.

**Conflicto de intereses.** Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Por otra parte, ninguna entidad comercial ha pagado ni pagará a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estemos afiliados.