

Selección, amplificación, inducción y diferenciación de células osteoprogenitoras: una alternativa para la reparación ósea

Selection, amplification, induction and differentiation of osteoprogenitor cells: an alternative for bone repair

Departamento de Biología Celular y Genética
Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga
* Division of Surgical Research
University of Southern California. Los Ángeles

Andrades J. A.
Santamaría J. A.
Nimmi M. E.*
Becerra J.

RESUMEN

La provisión continua de osteoblastos para el normal mantenimiento del hueso, así como para su remodelación y regeneración durante la reparación de fracturas, está asegurada por las células madre mesenquimáticas (MSCs) osteoprogenitoras de la médula ósea (BM). La diferenciación y maduración de células osteoprogenitoras en osteoblastos se cree que está modulada por factores de crecimiento transformante-beta (TGF- β 1 y TGF- β 2) y por proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) pertenecientes a la misma familia. Asimismo, los componentes de la matriz extracelular (ECM) son importantes en la diferenciación osteogénica, bien por su acción moduladora directa sobre las células implicadas, o por su carácter de intermediarios entre ciertas citoquinas y los precursores osteoblásticos. Con el fin de conocer la respuesta de las MSCs a varios factores de crecimiento (GFs), hemos cultivado células de BM en geles de colágeno con 0,5% de suero fetal bovino durante tiempos de cultivo prolongados. Bajo estas condiciones, la supervivencia de las MSCs de BM fue dependiente de la presencia de GFs. El factor recombinante humano TGF- β 1-F2 (rhTGF- β 1-F2), una proteína de fusión diseñada con el factor Von Willebrand (vWF) como dominio auxiliar de unión a colágeno, así como los factores rhBMP-7 y rhBMP-2, demostraron su capacidad para mantener el crecimiento de las células que sobrevivieron, así como la formación de colonias, mientras que el factor comercial equivalente (hTGF- β 1) no lo hizo.

Hemos demostrado que una nueva proteína de fusión, rhTGF- β 1-F2, en combinación con una matriz de colágeno tipo I, es capaz de capturar, amplificar y estimular la diferenciación de una población de células, con características de células osteoprogenitoras primitivas, presentes en la BM de rata. Posteriormente, cuando estas células fueron implantadas en ratas de edad avanzada, dentro de cámaras de matriz ósea desmineralizada e inactivada (iDBM), o en cámaras de difusión, fueron capaces de producir grandes cantidades de cartilago y hueso. Este procedimiento experimental permitirá en un futuro inmediato la aplicación clínica de estos resultados. Células osteoprogenitoras procedentes de BM de pacientes afectados por patologías esqueléticas podrán ser cultivadas, amplificadas e inducidas hacia el linaje osteoblástico, para posteriormente ser reimplantadas en los mismos pacientes, dirigidas hacia una reparación ósea determinada. Las técnicas de ingeniería genética permitirán la transfección de las células *in vitro*, para introducir algún carácter genético determinado que, una vez reimplantadas en el huesped, posibilite su expresión.

Palabras clave: Célula osteoprogenitora, matriz de colágeno, factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), proteína morfogenética de hueso (BMP), matriz ósea desmineralizada (DBM), cámara de difusión, osificación ectópica.

Andrades J A, Santamaría J A, Nimmi M E, Becerra J
Selección, amplificación, inducción y diferenciación de células osteoprogenitoras: una alternativa para la reparación ósea
Mapfre Medicina, 1999; 10: 190-201

ABSTRACT

A continuous source of osteoblasts for normal bone maintenance, as well as remodeling and regeneration during fracture repair, is ensured by the osteoprogenitor mesenchymal stem cells (MSCs) of the bone marrow (BM). The differentiation and maturation of osteoprogenitor cells into osteoblasts are thought to be modulated by transforming growth factors-beta (TGF- β 1 and TGF- β 2) and TGF- β related bone morphogenetic proteins (BMPs). Furthermore, the extracellular matrix (ECM) components are important in the osteogenic differentiation, either by their direct modulator action on the evolved cells, or by their mediator behaviour exerted between some cytokines and the osteoblastic precursors. To define the responses of MSCs to define growth factors (GFs), we cultured BM cells in medium containing 0.5% fetal bovine serum for prolonged periods of time. Under these conditions, survival of BM MSCs was dependent on the addition of GFs. Recombinant hTGF- β 1-F2, a fusion protein engineered to contain a von Willebrand's factor-derived (vWF) collagen-binding domain, rhBMP-7 and rhBMP-2 all demonstrated the ability to support colony formation and growth of the surviving cells, whereas commercial hTGF- β 1 did not. Initially, cells were selected from a whole BM cell population and captured inside a collagen network, in response to exogenous GFs added to the low-serum media.

We further report that a novel rhTGF- β 1-F2 fusion protein combined with a type I collagen matrix, is able to capture, amplify, and stimulate the differentiation of a population of cells present in rat BM with characteristics of primitive osteoprogenitor cells. When those cells were implanted in old rats, either into inactivated demineralized bone matrix (iDBM) or diffusion chambers, they produced large amounts of cartilage and bone. This experimental procedure will allow the clinical applications of these results in a near future. Osteoprogenitor cells from BM of patients with skeletal pathologies, could be cultured, amplified and induced toward the osteoblastic lineage, in order to be reimplanted in to the same patients for a specific osseous repair. The genetic engineering techniques will allow the *in vitro* cell transfection to insert a particular genetic character, which it could be expressed once the transfected cells are reimplanted into the host.

Key words: Osteoprogenitor cell, collagen matrix, transforming growth factor-beta (TGF- β), bone morphogenetic protein (BMP), demineralized bone matrix (DBM), diffusion chamber, ectopic ossification.

Andrades J A, Santamaría J A, Nimmi M E, Becerra J
Selection, amplification, induction and differentiation of osteoprogenitor cells: an alternative for bone repair
Mapfre Medicina, 1999; 10: 190-201

Correspondencia:

Dr. José Becerra Ratia
Dpto. Biología Celular y Genética
Facultad de Ciencias
Campus Universitario de Teatinos
29071 Málaga
E-mail: becerra@uma.es

Fecha de recepción: 5 de mayo de 1998

INTRODUCCIÓN

La capacidad normal para reparar las fracturas óseas se altera con frecuencia por diversas patologías (osteoporosis, fracturas especialmente difíciles, enfermedades periodontales, distintos traumatismos, etc.), así como por el envejecimiento. Hasta el momento se desconoce, en general, cuál es el mecanismo afectado, siendo diversas las líneas de investigación que tratan de profundizar en el mismo. Una de ellas, quizá la más activa, trata de conocer el procedimiento de reclutamiento de células progenitoras a partir de células madre pluripotenciales y su posterior amplificación y diferenciación *in vitro* hacia los distintos tipos celulares mesenquimáticos.

Si bien existe la posibilidad de cultivar directamente células cartilaginosas u óseas que, a su vez, podrían ser usadas para reparaciones de cartíla-

gos o huesos, hoy día está más extendida la estrategia experimental que trata de buscar las células madre mesenquimáticas (MSCs), susceptibles de diferenciarse en los distintos tipos celulares de origen mesodérmico, cuales son: osteoblastos, condroblastos, adipocitos, células musculares y los distintos tipos de fibroblastos pobladores de los diferentes tejidos conectivos, tendones y ligamentos. Este proceso diferenciador, denominado frecuentemente **mesengénesis**, es muy poco conocido, y la mayoría de la información disponible está referida a la osteogénesis, sin que se conozca, ni siquiera medianamente, si cada línea de diferenciación mantiene tipos celulares precursores independientes, o si son muchos los precursores compartidos. La Figura 1 representa una simplificación de lo que hoy se conoce, sin que se representen todos los estadios intermedios y, mucho menos, las interrelaciones entre los diferentes caminos de diferenciación.

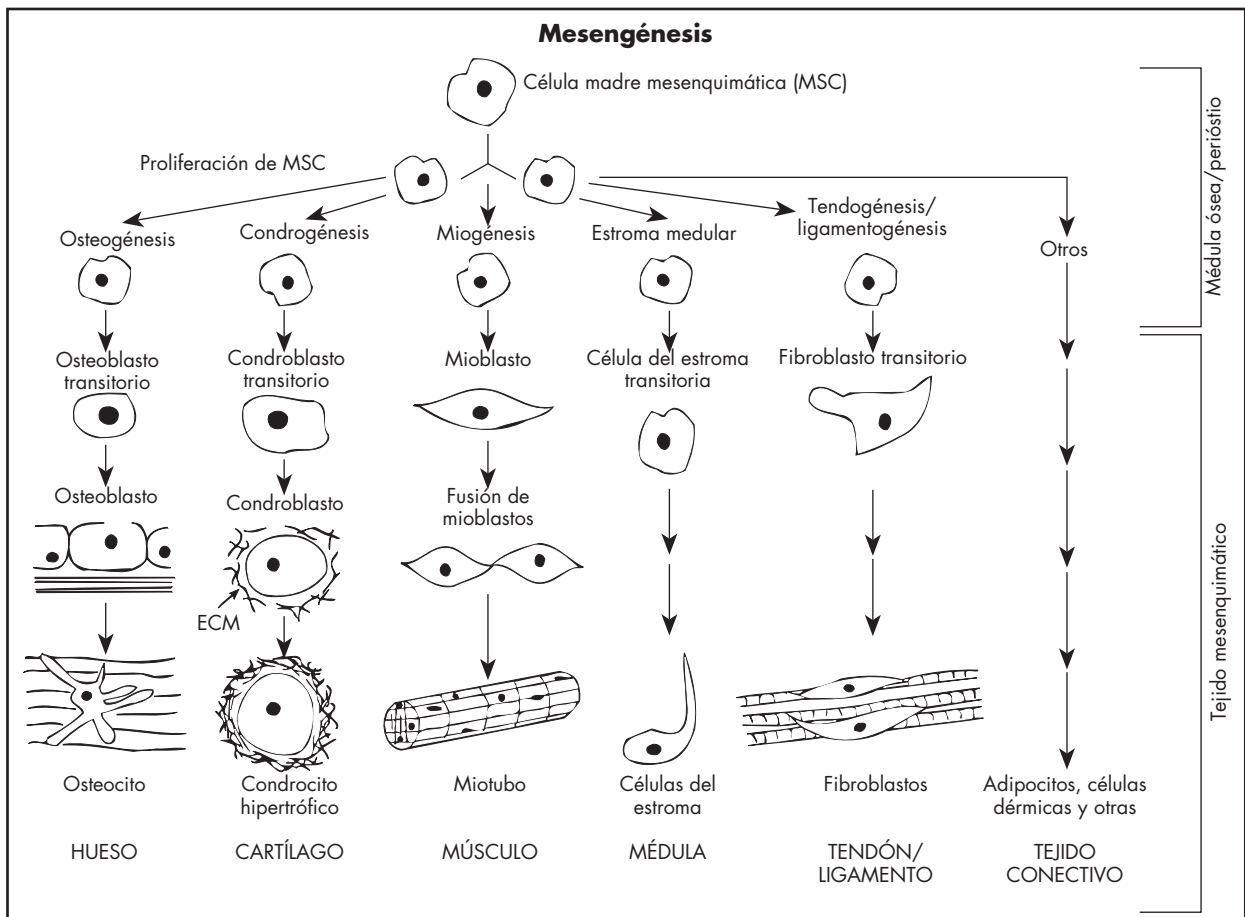


Figura 1. El proceso mesengénico. Las MSCs tienen la capacidad de diferenciarse en una variedad de tejidos mesenquimáticos, tales como hueso, cartilago, músculo, médula ósea, tendón/ligamento, grasa, dermis, etc. En cada uno de los caminos intervienen determinados GFs específicos que, principalmente, afectan a procesos proliferativos y diferenciadores. (Adaptado de la referencia bibliográfica 2, con permiso del autor).

Aunque el hueso de animales viejos puede regenerar tras una lesión, lo hace más lentamente y esto a pesar de que la actividad de los osteoblastos decrece con la edad (1). Caplan (2) ha demostrado en humanos que, mientras el número de células madre hematopoyéticas varía muy poco con la edad, el de MSCs lo hace enormemente; si en el recién nacido se encuentra una MSC por cada 10.000 células de médula ósea (BM), a los 80 años de edad sólo se puede encontrar una por cada dos millones. Los osteoblastos procedentes de donantes humanos de edad avanzada (superior a 70 años) responden a los nutrientes en cultivo, pero su capacidad proliferativa y biosintética es menor que la de células óseas fetales (3). Nimni y col. (4) han demostrado que la respuesta a la implantación de matriz ósea desmineralizada (DBM) decrece en ratas viejas, siendo estimulada por la administración de células osteoprogenitoras singénicas. Becerra y col. (5) han demostrado recientemente que las células de BM de ratas de edad avanzada cultivadas muestran un descenso en la expresión de fosfatasa alcalina (ALP), un enzima necesario para la mineralización esquelética, comparada con la obtenida en los cultivos de células de ratas más jóvenes. En estos casos, la adición de DBM en polvo estimula la síntesis de ALP sólo en algunas células, que son, probablemente, las que proceden de las pocas madres osteoprogenitoras que quedaban en la médula de los animales de estas edades (Figura 2). Por tanto, el descenso de la actividad anabólica observada en huesos de individuos más viejos no puede ser debida solamente a la incapacidad de los osteoblastos y sus progenitores a progresar, puesto que éstos lo hacen en cultivo (6). Es decir, con la edad disminuye enormemente el número de células susceptibles de diferenciación osteoblástica, además de apreciarse una cierta dificultad de progreso, por falta de factores o por incapacidad de las propias células.

CÉLULAS MADRE OSTEOGENITORAS

Aunque carecemos de pruebas formales de la existencia de células madre estromáticas, esta hipótesis, sin embargo, proporciona base conceptual útil desde la que investigar el potencial mesengénico del tejido estromático de la BM. Se han identificado células precursoras estromáticas en numerosas especies por su capacidad para formar colonias morfológicamente parecidas a fibroblastos (7, 8). El progenitor clonagénico responsable de la formación de colonias en estas condiciones

es conocido como unidad fibroblástica formadora de colonias (CFUF) (9). Basado en estos y otros datos, Owen (10) propuso la hipótesis de las células madre estromáticas (*stromal stem cells*). Células de BM cultivadas en condiciones que permiten el desarrollo osteogénico (L-ascorbato, dexametasona, dex, y β -glicerofosfato, β -GP) expresan un fenotipo osteoblástico (5, 11).

La mayor concentración de células madre en el adulto se ha encontrado en BM (12). Aunque todavía no se tienen datos directos sobre su estructura, evidencias indirectas las asimilan a linfocitos, aunque algunos investigadores han evitado en el pasado el uso de este término y preferían llamarlas «células madre candidatas» (13). La proporción de células madre en suspensiones de BM puede incrementarse destruyendo las células hematopoyéticas susceptibles de tratamiento con agentes tales como la vincristina, ya que las células madre se dividen menos. Puesto que estas células progenitoras progresan a través de una serie de tipos intermedios del linaje osteoblástico (14, 15), los anticuerpos que reconocen proteínas específicas superficiales de membrana, han ayudado en parte a caracterizar los distintos estados de desarrollo (16, 17). Asimismo se ha encontrado toda una serie de mediadores fisiológicos de la diferenciación osteoblástica, tales como factores de crecimiento (GFs), paratohormona, estrógeno y 1,25-dihidroxitamina D_3 . El uso de *northern blot*, hibridación *in situ*, e histoquímica, ha permitido mapear la expresión secuencial del crecimiento celular y de los genes tisulares específicos durante el desarrollo progresivo del fenotipo de célula ósea (18, 19). En un principio ocurre la proliferación, que asegura la expansión de la población y la síntesis de colágeno tipo I de la matriz ósea. En este momento, se expresan los genes necesarios para la activación de proliferación, progresión por el ciclo celular, proteínas de adhesión celular, biosíntesis de matriz extracelular y citoesqueleto. Posteriormente ocurre la expresión de genes asociados a la maduración y organización de la matriz ósea, como los de la ALP. Finalmente, la expresión de osteopontina y osteocalcina (OC), proteínas específicas de osificación, es máxima, a la vez que ocurre la organización típica del tejido óseo.

Aunque no existe un marcador único para las células del linaje osteogénico, las células producidas en estas condiciones muestran características de células óseas; por ejemplo, elevada expresión de ALP, producción de matriz ósea mineralizada y síntesis de OC dependiente de 1,25-vitamina D_3 . La formación de células parecidas a osteoblastos con estas características fenotípicas y funcionales, normalmente depende de la presencia de L-as-

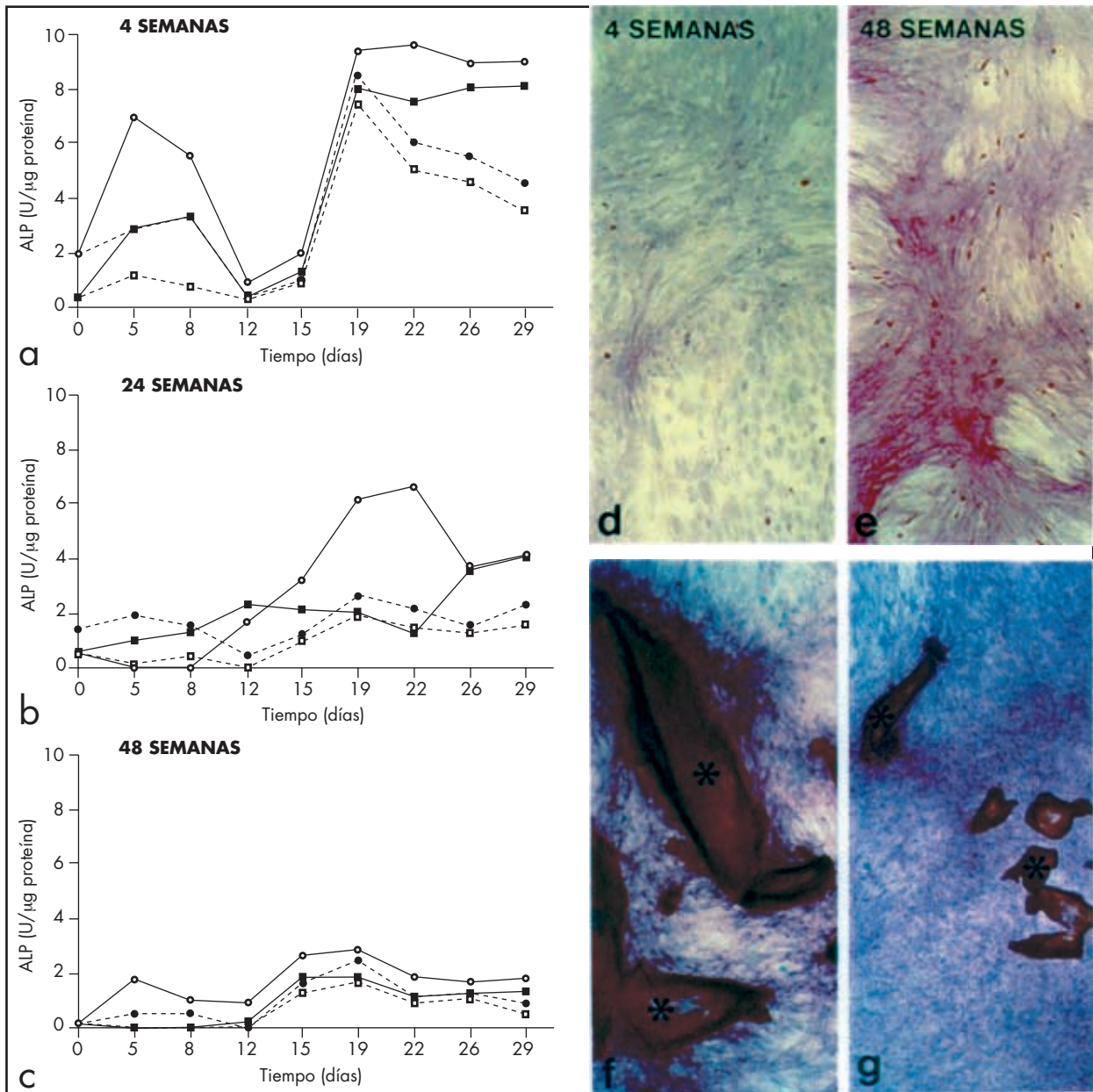


Figura 2. Niveles de expresión de ALP esquelética (cuadrados) y total (círculos), durante 28 días de cultivo de células estromáticas de BM procedentes de ratas de 4 (a), 24 (b) y 48 (c) semanas de edad, en ausencia (línea discontinua) y presencia (línea continua) de polvo de DBM. Junto a las gráficas mostramos cultivos secundarios de células del estroma de BM, teñidos con picosirio-hematoxilina. (d) x100 aumentos; (e) x100 aumentos. Asteriscos, polvo de DBM. (f) x100 aumentos; (g) x50 aumentos.

corbato, dex y una fuente de fosfato inorgánico (β -GP) (20). Otros estudios (21) no han tenido éxito en la identificación de marcadores de células osteoprogenitoras verdaderas, aunque reconocen células del linaje osteogénico usando anticuerpos monoclonales contra ALP.

FACTORES DE CRECIMIENTO, MATRIZ EXTRACELULAR Y OSTEOGÉNESIS

La respuesta celular que el organismo dispara ante una lesión ósea incluye la proliferación de fi-

broblastos o sus precursores mesenquimáticos, la infiltración de células inflamatorias, la diferenciación de condroblastos y osteoblastos a partir de células progenitoras y la formación de hueso por osificación endocondral o intramembranosa (22-24). Esto implica quimiotaxis y diferenciación de precursores osteoblásticos, así como expresión de GFs, citoquinas y proteínas como OC, osteopontina y colágeno tipo I, entre otras (25, 26). La matriz ósea contiene numerosos factores, entre los que se incluye algún miembro de la superfamilia de los TGF- β , que estimulan la formación de hueso y parecen actuar en diferentes momentos del linaje osteoblástico.

El TGF- β 1 es uno de los factores más abundantes. Se libera en forma activa durante la reabsorción ósea (27), estimula la proliferación de osteoblastos (28), causa quimiotaxis entre osteoblastos e incrementa la formación de hueso (29). Las proteínas morfogenéticas (BMPs) pertenecen a esta familia pero sus efectos difieren de los del TGF- β propiamente dichos. Las BMPs realizan la diferenciación de células óseas *in vitro* (30) y parecen estar implicadas en dirigir las células a lo largo del linaje osteoblástico. Son únicas en producir la formación de hueso ectópico (31-33), lo que no producen los TGF- β . Por todo ello, las BMPs se están ensayando con entusiasmo como potenciales agentes terapéuticos.

Otros GFs como el fibroblástico (FGF), plaquetario (PDGF) e insulínico I y II (IGF I y II) han mostrado ciertos efectos en proliferación y diferenciación de células óseas, siendo también usados en este campo de la investigación (26, 34).

Aunque los GFs citados parecen ser los de más presencia en procesos osteogénicos, no debe descartarse la implicación de otros, toda vez que se conocen cientos de ellos, agrupados en más de 20 familias moleculares (35). Dependiendo de la proximidad entre los lugares de síntesis y acción, los GFs se han clasificado como endocrinos, paracrinos y autocrinos, usándose también los términos yuxtacrino e intracrino para interacciones a corta distancia (Figura 3).

Aunque algunos estudios recientes han empezado a desenmascarar el papel que los componentes de la matriz extracelular (ECM), tales como fibronectina, trombospondina, colágenos III y IV y glucosaminoglucanos específicos, desempeñan en la proliferación y diferenciación de células del linaje hematopoyético (36, 37), se sabe menos de su efecto sobre las células osteoprogenitoras y su diferenciación. Se ha observado (38) que ciertas citoquinas actúan junto a moléculas de la ECM para anclar células madre en un microambiente y modular su función, y que ciertos rasgos osteoblásticos pueden ser importantes en esta conexión (39).

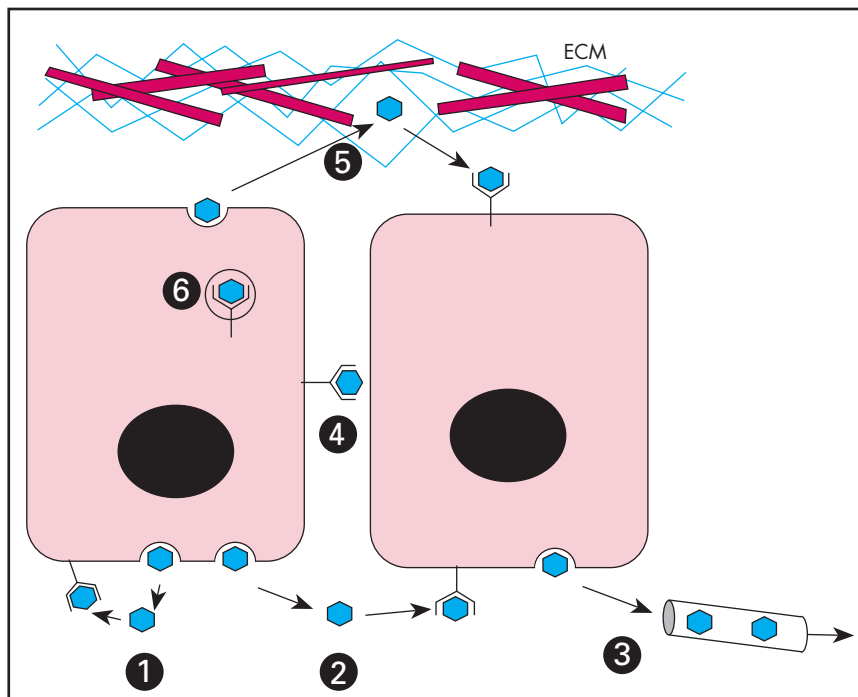


Figura 3. Varias vías por las que los GFs desarrollan sus actividades. Los GFs (azul) son producidos por las células, pudiendo actuar en el interior de las mismas, en su vecindad, o en lugares más alejados, modulando su actividad al interactuar con receptores específicos. Estas vías pueden ser: (1) autocrina, (2) paracrina; (3) endocrina, (4) yuxtacrina, (5) mediada por la ECM, (6) intracrina. (Adaptado de la referencia bibliográfica 35)

El colágeno I puede promover la aparición de fenotipo osteoblástico en algunos sistemas celulares, comprobado por el incremento de la actividad ALP y síntesis de OC y osteopontina, así como cambios en la morfología celular (40, 41). También se ha observado estimulación de diferenciación osteogénica con otros componentes no colagénicos de la ECM, como laminina y fibronectina (42, 43). Usando una línea celular clonal multipotencial (44, 45), se ha encontrado que estas células pueden llegar a ser osteoblásticas en presencia de BMP-2 y ácido retinoico. La adición de colágeno I parece necesaria para la expresión del fenotipo osteoblástico por células mesenquimáticas inmaduras (45). Recientemente, Hasegawa y col. (46) consiguieron producir tejido con características óseas en cultivos de células de BM de rata, en un gel de colágeno en ausencia de dex. Una red tridimensional de colágeno parece ser esencial. Posteriormente, el mismo grupo (47) encontró que el TGF- β 1, al añadirlo al gel de colágeno, realza todavía más el proceso de diferenciación osteogénico.

Asimismo y de acuerdo con nuestros resultados, geles de colágeno I suplementados con un TGF- β 1, al que se adhiere por ingeniería genética un polipéptido de alta afinidad por el colágeno I (rhTGF- β 1-F2) y mínima concentración de suero durante los primeros diez días de cultivo, permiten seleccionar de BM de rata una población celular que expresa marcadores óseos *in vitro* (48,

49) (*) y es capaz de inducir formación de cartílago y hueso *in vivo*. El procedimiento experimental seguido en este caso se ha revelado muy eficaz para seleccionar, amplificar e inducir la diferenciación condro-osteogénica, partiendo de una mezcla heterogénea de células de BM (Figura 4). Lo que hicimos fue desarrollar un sistema para seleccionar, amplificar e inducir una población de células osteoprogenitoras procedentes de BM de rata, basado en la interacción de las mismas con una matriz de colágeno y GFs pertenecientes a la familia TGF- β . Las células de BM se obtuvieron de ratas Fischer-344 machos de cuatro semanas de edad. Durante los primeros diez días de cultivo (período de selección, PS), los cultivos se mantuvieron en medio con suero fetal bovino a muy baja concentración (0,5% FBS) con el fin de eliminar la mayor parte de células de la línea hematopoyética. En el día 11 de cultivo se inició el período de amplificación (PA), que consistió en cambiar a medio de cultivo completo (10% FBS) para estimular la proliferación de las células que hubieran sido capturadas. En el día 15 (período de inducción, PI) se pone a los cultivos en presencia de dex 10^{-8} M y β -GP 2 mM, que se añadieron a

(*) ANDRADES J A, BECERRA J, SORGENTE N, HAN B, HALL F L, NIMNI M E. 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.* (en prensa).

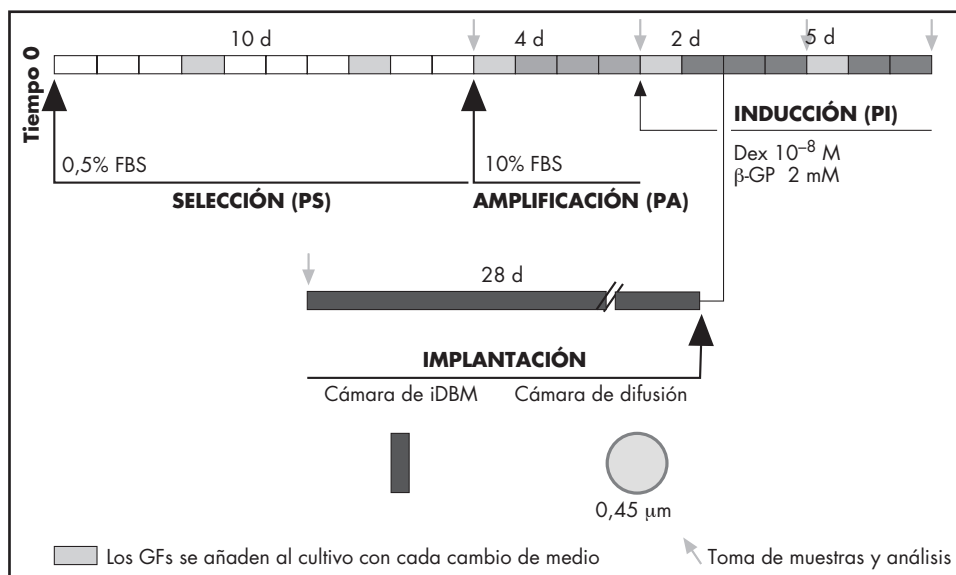


Figura 4. Diagrama representativo del procedimiento experimental seguido (ver explicación en el texto).

los cultivos con cada cambio de medio. Ambas sustancias son inductores osteogénicos *in vitro* que promueven la expresión de marcadores óseos, como es el caso de la dex que estimula la expresión de ALP, necesaria para la mineralización, o el β -GP, que eleva los niveles de fósforo inorgánico, necesario para la formación de fosfato cálcico. Estudiamos las células cultivadas a lo largo del camino condro-osteogénico en lo que se refiere a expansión (proliferación celular y síntesis de ADN) y diferenciación [actividad ALP, expresión de OC, contenido de calcio (Ca) y respuesta condrogénica]. La inducción osteogénica promovida en las células sometidas al procedimiento anteriormente descrito viene avalada por la expresión de marcadores osteogénicos, como se ilustra en la Figura 5. Otros aspectos de citodi-

ferenciación han sido ya descritos anteriormente (48). Asimismo, y tras 16 días de cultivo (al segundo día de inducción), desarrollamos experimentos *in vivo* de osteogénesis ectópica implantando las células seleccionadas en cámaras de DBM inactivada (iDBM) y de difusión, bajo la piel de la espalda de ratas machos de edad avanzada (28 semanas). Cuatro semanas más tarde, los animales se sacrificaron y los implantes se extrajeron para ser sometidos a análisis bioquímico y estudio histológico.

Para investigar la capacidad de desarrollar actividad osteogénica *in vivo* por las células procesadas *in vitro*, se ha seguido la metodología ampliamente ensayada de implantar dichas células en cámaras de difusión (Figuras 6a, c) (50, 51). El tejido formado, aunque avascular, se asemeja al

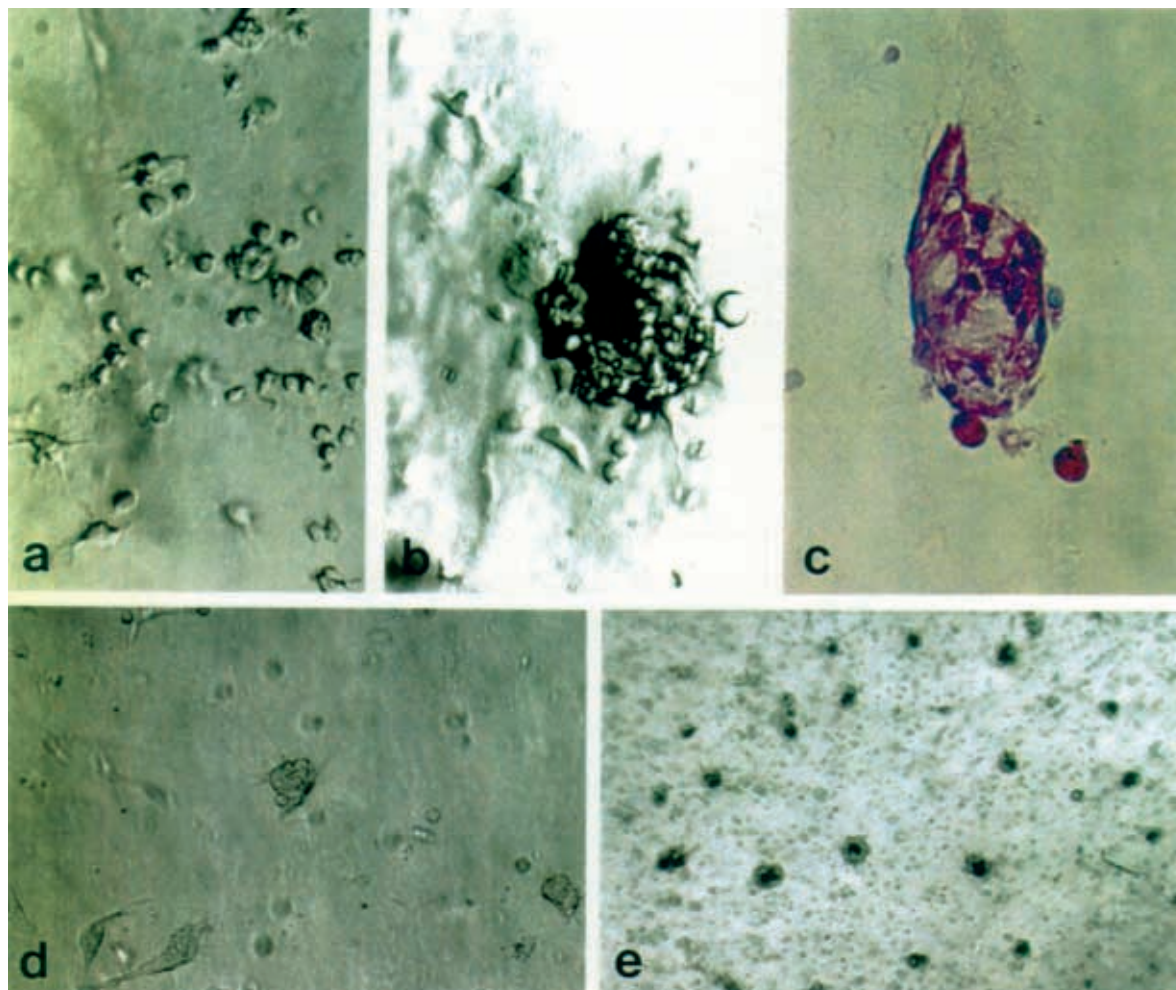
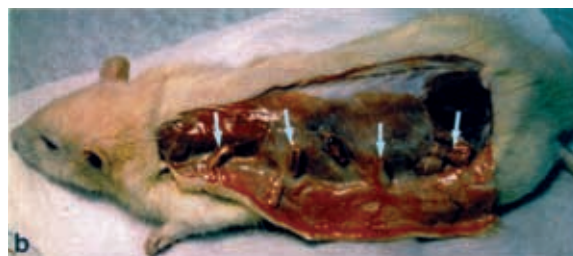


Figura 5. Morfología de los cultivos *in vitro*. El rhTGF- β 1-F2 seleccionó una población de células de morfología cuboidal típica de osteoblastos en el PS. (a) $\times 150$ aumentos; (b) $\times 200$ aumentos; (d) $\times 100$ aumentos; (e) $\times 80$ aumentos. La Figura (c) muestra una colonia similar a la de la Figura (b), procesada para microscopía óptica convencional y teñida con hematoxilina-eosina. $\times 200$ aumentos.



Figura 6. (a) Las células se implantaron en cámaras de iDBM (flecha), o en cámaras de difusión (doble flecha) formadas por un anillo plástico (cabeza de flecha) al que por ambos lados se le pegan (adhesivo, flecha larga) sendos filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro (asteriscos). La implantación se realizó bajo la piel de la espalda de ratas Fischer-344 machos de 28 semanas de edad (b, c). Barra, 1 cm.



óseo visto con microscopía óptica y electrónica. La expresión temporal de componentes celulares y extracelulares es similar a la observada en los procesos de osteogénesis (52, 53). La mezcla de hueso, cartílago y tejido fibroso formados en las cámaras de difusión parece ser producida por un escaso número de células precursoras (54). Nimni y col. (4) han experimentado el uso de cámaras fabricadas con cilindros de iDBM, sellados en ambos extremos con filtros porosos (Figuras 6a, b). Nuestros resultados con el uso de estas cámaras ha permitido por vez primera formar hueso y cartílago con las células cultivadas *in vitro* en presencia de rhTGF- β 1-F2 (Figura 7) (*).

PERSPECTIVAS DE FUTURO: TERAPIA AUTÓLOGA

Estudios recientes sugieren que el colágeno junto con el TGF- β podrían mantener la supervivencia y/o expresión de fenotipos osteogénicos (46, 47), por lo que, en nuestro estudio, la matriz de colágeno podría estar ejerciendo un efecto sinérgico con el rhTGF- β 1-F2 en la elaboración de un sistema de captura para MSCs.

A pesar de que ya han sido descritos métodos de aislamiento de células madre hematopoyéticas mediante condiciones de crecimiento selectivo (55), la captura de MSCs mediante matrices colagénicas representa una estrategia novedosa.

Además, el TGF- β no había sido demostrado hasta ahora como GF capaz de mantener viva una población celular cultivada en condiciones extremas (bajo suero). El diseño del rhTGF- β 1-F2 con un dominio de unión al colágeno, le atribuye propiedades que no se encuentran en la forma natural del TGF- β (56). Esta nueva proteína podría desarrollar un papel importante en la captura de células progenitoras blastoideas, que responden a un factor cuya estabilidad está mejor preservada gracias a su anclaje a la matriz colagénica, lo que además le permite ser liberado lentamente al medio de cultivo alargando notablemente su vida media (*).

Hay pocas dudas de que, según progresen nuestros conocimientos, los trastornos de la formación de hueso podrán ser remediados con la aportación de los GFs apropiados. La administración sistémica de GFs de hueso, tales como las BMPs o TGFs- β , podrá ser útil para tratar enfermedades tales como la osteoporosis, si aquéllos pueden ser dirigidos al hueso. Una alternativa a la administración sistémica o local podría incluir la recolección de BM para ser cultivada siguiendo el modelo experimental *in vitro* de la Figura 4. Esto es, se realizaría una selección y posterior amplificación de las células progenitoras del paciente, mediante GFs y matrices colagénicas *in vitro*. Estas células podrían seguir luego, al menos, tres caminos según las necesidades: a) podrían ser congeladas para que sirvieran de almacén de células para posteriores aplicaciones; b) podrían ser

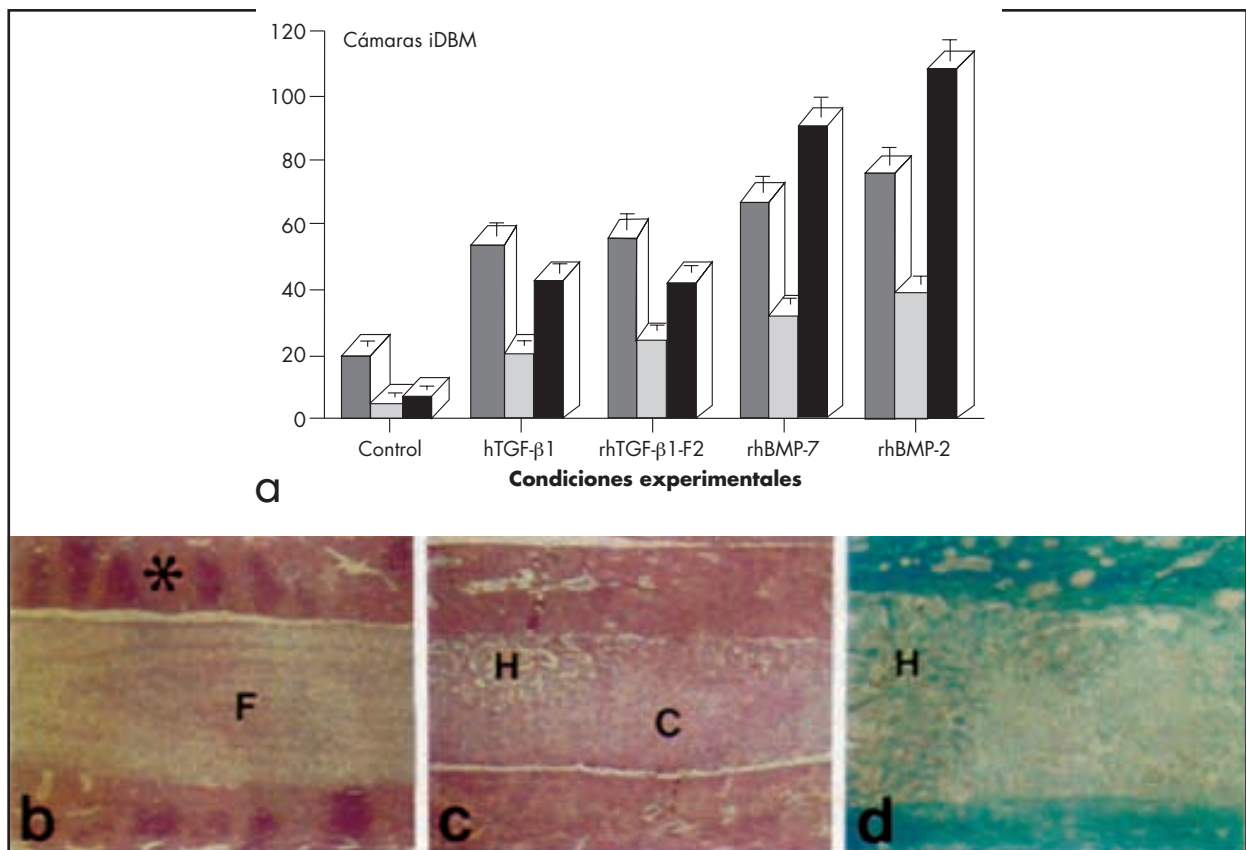


Figura 7. (a) Niveles de ALP (U/μg ADN) (barra rayada), OC (ng/μg ADN) (barra punteada) y Ca (μg/mg peso seco) (barra lisa) en las cámaras de iDBM implantadas con células cultivadas bajo las distintas condiciones experimentales. La histología muestra formación de hueso (H) por las células tratadas con el rhTGF-β1-F2 (c, tinción de hematoxilina-eosina) y abundante cartílago (C). Las cámaras que contenían células tratadas con rhBMP-2 (d, tinción de azul alciano) estaban repletas de hueso (H), mientras que las que contenían células cultivadas en ausencia de GF (b, tinción de hematoxilina-eosina) sólo presentaban un tejido fibrilar (F). Asterisco, pared de las cámaras de iDBM. x50 aumentos.

sometidas a un PI osteogénico, de manera similar al realizado con dex y β-GP para, seguidamente, ser reimplantadas en pacientes con problemas de reparación ósea. Las situaciones pueden ser las debidas a fracturas que no sueldan (por ejemplo, pacientes de edad avanzada), donde podrían inyectarse directamente las células capacitadas en las fracturas, solas o convenientemente vehiculizadas, o como consecuencia de pérdidas masivas de masa ósea (por ejemplo, traumatismos, asimetrías de huesos largos, etc.), donde las células inducidas se absorberían a vehículos porosos, tales como la hidroxiapatita (HA), de demostrada utilidad osteogénica (57), para ser implantados en los defectos del hueso. Además c), las células osteoprogenitoras capturadas pueden ser modificadas por técnicas de transferencia génica para segregar citoquinas o cualquier otro factor que

module la cicatrización de heridas y los procesos osteoinductivos que, en enfermedades óseas incurables como la osteogénesis imperfecta, estén impedidos. En esta tercera vía, por ingeniería génica las células amplificadas serían transfectadas con retrovirus que contengan un gen deseado (gen X). A continuación, estas células serían inyectadas intravenosamente en el paciente que, previamente, habría sido sometido a irradiación o quimioterapia de su BM, con el fin de asegurar la eliminación de las células deficientes y que las células transfectadas colonicen rápidamente la médula deprimida. La representación esquemática de la Figura 8 explica el procedimiento experimental general que estamos desarrollando y que posibilitará en un futuro no muy lejano la aplicación clínica de nuestros resultados obtenidos en los últimos años.

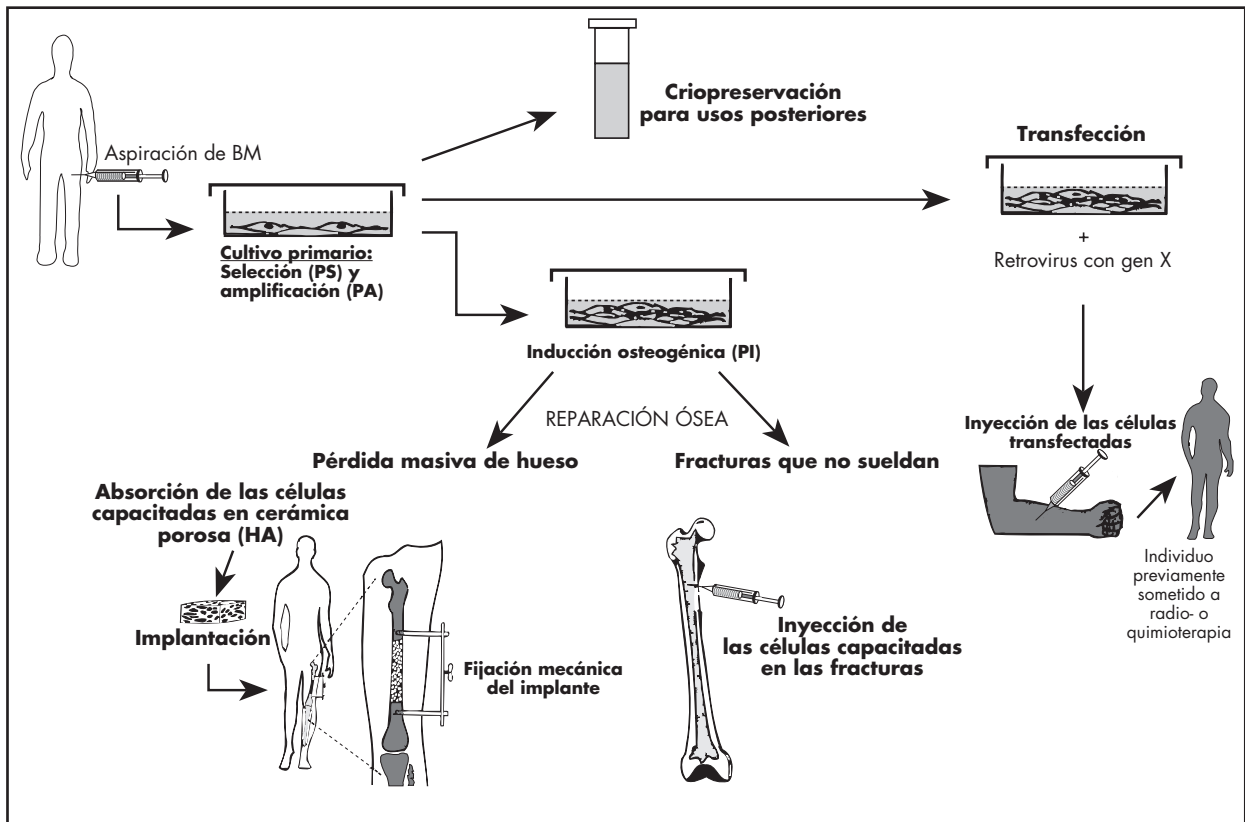


Figura 8. Estrategias experimentales propuestas para la regeneración ósea.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Fundación MAPFRE Medicina, al amparo de la Ayuda de Investigación de 1996. Han completado su financiación los proyectos PB95/1134 (DGICYT, España) y AGO2577 (NIH, Estados Unidos). Los autores están muy agradecidos a Robin T. Simpkins (Childrens Hospital Los Angeles, University of Southern California) y a Silvia Hernández (Departamento Biología Celular y Genética, Universidad de Málaga) por su excelente asistencia técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- MEUNIER P J. Assessment of bone turnover by histomorphometry in osteoporosis. En: B L Riggs, L J Melton (eds), *Osteoporosis, Etiology, Diagnosis and Management*. Nueva York: Raven Press, 1988; 317-332.
- CAPLAN A I. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. 1994; 21: 429-435.
- GEHRON R P, TERMINE J D. Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int*. 1985; 37: 453-460.
- NIMNI M E, BERNICK S, ERTL D C, NISHIMOTO S K, STRATES B, VILLANUEVA J. Ectopic bone formation in senescent animals implanted with embryonic calvaria cells. *Clin Orthop Rel Res*. 1988; 234: 255-266.
- BECERRA J, ANDRADES J A, ERTL D C, SORGENTE N, NIMNI M E. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res*. 1996; 11: 1703-1714.
- TERMINE J D. Cellular activity, matrix proteins and aging bone. *Exper Gerontol*. 1990; 25: 217-221.
- CASTRO-MALASPINA H, GAY R E, RESNICK G, KAPOOR N, MEYERS P, CHIARIERI D, MCKENZIE S, BROXMEYER H E, MOORE M A. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980; 56: 289-301.
- PERKINS S, FLEISCHMAN R A. Stromal cell progeny of murine bone marrow fibroblast colony forming units are clonal endothelial-like cells that express collagen IV and laminin. *Blood*. 1990; 75: 620-625.
- FRIEDENSTEIN A J. Stromal mechanocytes of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. En: S M Thiernfelder (ed), *Immunology of bone marrow transplantation*. Berlin: Springer-Verlag Berlin, 1980; 19.

10. OWEN M E. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. En: W A Peck (ed), *Bone and Mineral Research*. Amsterdam: Elsevier, 1985; 3.^a ed, 1.
11. SCHOETERS G E, DE SAINT-GEORGES L, VAN DEN HEUVEL R, VANDERBORGHT O. Mineralization of adult mouse bone marrow in vitro. *Cell Tissue Kinet*. 1988; 21: 363-374.
12. WEISS L. The life cycle of blood cells. En: L Weiss, R O Greep (eds), *Histology*. Nueva York: McGraw-Hill Inc, 1977; 459-486.
13. FRIEDENSTEIN A J, CHAILAKHJAN R K, LALYKINA K S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; 3: 393-403.
14. HAYNESWORTH S E, GOSHIMA J, GOLDBERG V M, CAPLAN A I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992; 13: 818-888.
15. VILAMITJANA-AMEDEE J, BAREILLE R, ROUAIS F, CAPLAN A I, HARMAND M F. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1993; 29: 699-707.
16. TURKSON K, AUBIN J E. Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *J Cell Biol*. 1991; 114: 373-384.
17. HAYNESWORTH S E, BABER M A, CAPLAN A I. Cell surface antigens on human marrow derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1992a; 13: 69-80.
18. STEIN G S, LIAN J B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*. 1993; 14: 424-442.
19. STEIN G S, LIAN J B, STEIN J L, VAN WIJNEN A J, MONTECINO M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev*. 1996; 76: 593-629.
20. RICKARD D J, SULLIVAN T A, SHENKER B J, LEOY P S, KAZHDA I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell culture by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol*. 1994; 161: 218-228.
21. BRUDER S P, FINK D J, CAPLAN A I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cellular Biochem*. 1994; 56: 283-294.
22. URIST M R, WALLACE T H, ADAMS T. The function of fibrocartilaginous fracture callus: observations of transplants labelled with tritiated thymidine. *J Bone Joint Surg*. 1966; 47B: 304-318.
23. BOLANDER M E. Regulation of fracture repair by growth factors (434101). *PSEBM*. 1992; 200: 165-170.
24. REDDI A H. Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells. *Clin Orthop Rel Res*. 1995; 313: 115-119.
25. EINHORN T A, MAJESKA R J, RUSH E B, LEVINE P M, HOROWITZ M C. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res*. 1995; 10: 1272-1281.
26. MUNDY G R. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop Rel Res*. 1996; 324: 24-28.
27. PFEILSCHIFTER J, MUNDY G R. Modulation of transforming growth factor beta activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci*. 1987; 84: 2024-2028.
28. NODA M, CAMILLIERE J J. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology*. 1989; 124: 2991-2994.
29. MACKIE E J, TRECHSEL U. Stimulation of bone formation in vivo by transforming growth factor beta-remodeling of woven bone and lack of inhibition by indomethacin. *Bone*. 1990; 11: 295-300.
30. HARRIS S E, BONEWALD L E, HARRIS M A. Effects of TGF-B on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein-2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase and type I collagen mRNA in prolonged cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 1994; 9: 855-863.
31. URIST M R. Bone: Formation by autoinduction. *Science*. 1965; 150: 893-899.
32. WOZNEY J M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev*. 1992; 32: 160-167.
33. REDDS A H. Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1992; 4: 850-855.
34. ISHIBE M, NOJIMA T, ISHIBASHI T, KODA T, ROSIER R N, PUZAS J E, KANEDA K. Comparison of the type-2 insulin-like growth factor receptor in normal osteoblasts and osteosarcoma-derived osteoblasts-like cells. *J Orthop Res*. 1995; 13: 643-648.
35. NIMNI M E. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials*. 1997; 18: 1201-1225.
36. LONG M W, DIXIT V M. Thrombospondin functions as a cytoadhesion molecule for human hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1990; 75: 2311-2318.
37. LUIKART S D, MANIGLIA L T, FURCHT J B, MCCARTHY J B, OEGEMA R T Jr. A heparin sulfate fraction of bone marrow induces maturation of HL60 cells in vitro. *Cancer Res*. 1990; 50: 3781-3785.
38. LONG M W, BRIDDELL R, WALTER A W, BRUNO E, HOFFMAN R. Human hematopoietic stem cells adherence to cytokines and matrix molecules. *J Clin Invest*. 1992; 90: 251-255.
39. MAJESKA R J, PORT M, EINHORN T A. Attachment to extracellular matrix molecules by cells differing in the expression of osteoblastic traits. *J Bone Miner Res*. 1993; 8: 277-289.
40. MASI L, FRANCHI A, SANTUCCI M, DANIELLI D, ARGANNI L, GIANNONE V, FORMIGLI L, BENVENUTI S, TANINI A, BEGHE F, MIAN M, BRANDI M L. Adhesion growth and matrix production by osteoblasts on collagen substrata. *Calcif Tissue Int*. 1992; 51: 200-212.
41. LYNCH M P, STEIN J L, STEIN G S, LIAN J B. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblasts phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res*. 1995; 216: 35-45.
42. QUARLESS L D, YOHAY D A, LEVER L W, CATON R, WENSTRUP R J. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res*. 1992; 7: 683-692.
43. TRAIANEDES K W, MARTIN P J, FINDLAY D M. Cell substratum modulates responses of preosteoblasts to retinoic acid. *J Cell Physiol*. 1993; 157: 243-252.

44. YAMAGUCHI A, KAHN A J. Clonal osteogenic cell lines express myogenic and adipocytic development potential. *Calcif Tissue Int.* 1991; 49: 221-225.
45. SHI S, KIRK M, KAHAN A J. The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res.* 1996; 11: 1139-1145.
46. HASEGAWA T, OGUCHI H, MIZUNO M, KUBOKI Y. The effect of the extracellular matrix on differentiation of bone marrow stromal cells to osteoblasts. *Jpn J Oral Biol.* 1994; 36: 383-394.
47. MIZUNO M, KUBOKI Y. TGF-beta accelerated the osteogenic differentiation of bone marrow cells induced by collagen matrix. *Biochem Biophys Res Comm.* 1995; 211: 1091-1098.
48. ANDRADES J A, NIMNI M E, HAN B, ERTL D C, HALL F L, BECERRA J. Type I collagen combined with a recombinant TGF β serves as a scaffold for mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol.* 1996; 107-108.
49. GORDON E M, SKOTZKO M, KUNDU R K, HAN B, ANDRADES J, NIMNI M, ANDERSON W F, HALL F L. Capture and expansion of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with a transforming growth factor- β 1-von Willebrand's factor fusion protein for retrovirus-mediated delivery of coagulation factor IX. *Human Gene Therapy.* 1997; 8: 1385-1394.
50. BRUDER S P, GAZIT D, PASSI-EVEN L, BAB I, CAPLAN A I. Osteochondral differentiation and the emergence of stage-specific osteogenic cell-surface molecules by bone marrow cells in diffusion chambers. *J Bone Miner Res.* 1990; 11: 141-151.
51. THOMSON B M, BENNETT J, DEAN V, TRIFFITT J T, MEIKLE M C, LOVERIDGE N. Preliminary characterization of porcine bone marrow stromal cells: skeletogenic potential, colony-forming activity and response to dexamethasone, transforming growth factor- β and basic fibroblast growth factor. *J Bone Miner Res.* 1993; 8: 1173-1183.
52. ASHTON B A, ALLEN T D, HOWLETT C R, EAGLSOM C C, HATTORI A, OWEN M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Rel Res.* 1980; 151: 294-307.
53. BAB I, ASHTON B A, SYFTTESTAD G T, OWEN M E. Assessment of an in vivo diffusion chamber method as a quantitative assay for osteogenesis. *Calcif Tissue Int.* 1984; 36: 77-82.
54. BAD I, ASHTON B A, GAZIT D, MARK G, WILLIAMSON M C, OWEN M E. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *J Cell Sci.* 1986; 84: 139-151.
55. BERARDI A C, WANG A, LEVINE J D, LÓPEZ P, SCADDEN D T. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science.* 1995; 267: 104-108.
56. TUAN T L, CHEUNG D T, WU L T, YEE A, GABRIEL S, HAN B, MORTON L, NIMNI M E, HALL F L. Engineering expression and renaturation of targeted TGF-beta fusion proteins. *Connect Tissue Res.* 1996; 34: 1-9.
57. OHGUSHI H, GOLDBERG V M, CAPLAN A I. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res.* 1989; 7: 568-578.

**Congreso Internacional
25 Aniversario de AEDES
Reto social para el próximo
milenio: Educación
para la diversidad**

Madrid, 4-7 de diciembre de 1999

Información:

C/ General Oráa, 55
28006 Madrid

Teléfono/fax: 34 91 564 51 68

E-mail: aedes@ctv.es

Web: <http://www.ctv.es/USERS/aedes>

**Seminario sobre
Coagulación y Fibrinólisis
en Cirugía**

Málaga, 17 y 18 de diciembre de 1999

Organizado por GIEMSA (Grupo Internacional
de Estudios Multidisciplinarios Sobre Autotransfusión)

Información:

Dr. M. Muñoz

Departamento Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Medicina

Universidad de Málaga

Campus de Teatinos

29071 Málaga

Teléfono: 952 13 15 40 - Fax: 952 13 15 34

E-mail: mmunoz@uma.es