



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Modificación experimental de la técnica de membrana inducida (Masquelet) mediante uso de medios condicionados producidos por células madre mesenquimales

Gabriel Fernando Fletscher Covaleta

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía
Unidad de Ortopedia y Traumatología
Bogotá D.C, Colombia

2014

Modificación experimental de la técnica de membrana inducida (Masquelet) mediante uso de medios condicionados producidos por células madre mesenquimales

Gabriel Fernando Fletscher Covaleda

Código: 05598769

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Ortopedia y Traumatología

Director:

Dr. Enrique Vergara Amador

Codirectores:

Dr. Orlando Chaparro

Dra. Itali Linero

Línea de Investigación:

Cirugía ortopédica –Ciencias Básicas – Tecnología de Tejidos

Grupos de Investigación:

Grupo de Investigación Unidad de Ortopedia y Traumatología

Grupo de Investigación Biología de Células Madre

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía
Unidad de Ortopedia y Traumatología
Bogotá D.C, Colombia

2014

A mi familia, motivadores de mi vida...

Resumen

INTRODUCCIÓN: La reconstrucción de defectos óseos segmentarios en huesos largos continúa siendo un reto para el cirujano ortopedista, y las técnicas quirúrgicas disponibles tienen múltiples limitaciones. La técnica de reconstrucción en dos tiempos a través de la inducción de membrana descrita por el Dr. Alain Masquelet aún está en desarrollo y una de sus limitaciones radica en el volumen del injerto óseo. El objetivo del presente trabajo es evaluar mediante un modelo animal experimental la utilización de medios condicionados, productos de la secreción paracrina de células madre mesenquimales (MSC), como alternativa al uso de injerto óseo en el segundo tiempo quirúrgico de la técnica y, estudiar los aspectos biológicos de la expansión y diferenciación de las células madre mesenquimales in vivo en la búsqueda de estrategias terapéuticas para el tratamiento de defectos óseos estructurales en huesos largos.

MATERIALES Y METODOS: Estudio experimental en modelo animal. 9 Conejos en los cuales se reprodujo la técnica de membrana inducida posterior a la creación de un defecto óseo de 1 cm en la diáfisis femoral. Durante la primera intervención se realizó estabilización de la osteotomía con un fijador externo diseñado para la especie animal y colocación de polimetilmetacrilato (PMMC) en el área del defecto óseo. Durante el segundo tiempo quirúrgico se dividieron los animales en cuatro grupos para evaluar el efecto paracrino de la MSC y su expansión y diferenciación celular. Se realizó evaluación radiológica 4 semanas posterior a la intervención y se compararon los hallazgos entre los diferentes grupos en relación al porcentaje de cierre del defecto óseo.

RESULTADOS: En todos los grupos se confirmó la capacidad osteoinductora de la membrana en ausencia de injerto óseo; esta capacidad se aumenta mediante el uso de medios condicionados derivados de cultivos de MSC, logrando un 98% de cierre del defecto óseo.

DISCUSIÓN: Es posible la utilización de medios condicionados producidos por células madre mesenquimales, basado en su efecto paracrino, como alternativa al injerto óseo durante el segundo tiempo quirúrgico en la técnica de Masquelet en conejos, para el tratamiento de defectos óseos en huesos largos. De esta forma, se plantea una alternativa para el tratamiento de defectos óseos en huesos largos y posible modificación de la técnica de Masquelet.

Palabras Clave: Técnica de Masquelet, Células Madre Mesenquimales, Huesos largos.

Abstract

INTRODUCTION: Reconstruction of segmental defects in long bones remains a challenge for the orthopedic surgeon and surgical techniques available have many limitations. The two times reconstruction technique through induction of membrane described by Dr. Alain Masquelet is still in development and one of its limitations lies in the volume of bone graft. The aim of this study is to evaluate in an experimental animal model the use of conditioned media, products of paracrine secretion of mesenchymal stem cells (MSC) as an alternative to bone graft in the second surgical time and study the biological aspects of the expansion and differentiation of MSC in vivo in the search for therapeutic options for the treatment of structural bone defects in long bones strategies.

MATERIALS AND METHODS: Experimental study on animal model. 9 rabbits in which the technique of induced membrane was reproduced later of a creation of a bony defect of 1 cm in the femoral shaft. During the first intervention the stabilization of the osteotomy was performed with an external fixator designed for this animal specie and placement of polymethylmethacrylate (PMMC) in the area of the bone defect. During the second operation the animals were divided into four groups to evaluate the paracrine effect of the MSC and their expansion and differentiation. Radiological evaluation was performed 4 weeks after the intervention and the findings between different groups were compared on the percentage bone defect closure.

RESULTS : In all groups, the osteoinductive capability of the membrane in the absence of bone graft is confirmed; this capacity is increased by the use of conditioned media derived from a MSC culture, achieving a 98 % closure of the bone defect.

DISCUSSION : It is possible using conditioned media produced by mesenchymal stem cells based on its paracrine effect, as an alternative to bone graft during the second procedure in the Masquelet technique in rabbits, for treating bone defects in long bones. The conditioned media are an alternative for the treatment of long bone defects and possible modification of the Masquelet technique.

Keywords: Masquelet technique, Mesenchymal stem cells, Long bones.

Contenido

Resumen.....	IV
Lista de figuras.....	IX
Lista de tablas.....	X
Lista de abreviaturas.....	XI
Introducción.....	1
1. Objetivos.....	2
1.1 Objetivo Geneal.....	2
1.2 Objetivos Específicos	2
2. Marco Teórico	4
2.1 Técnica membrana inducida (Masquelet)	4
2.2 Células madre mesenquimales (MSC).....	5
2.3 El futuro de la técnica de membrana inducida	8
3. Metodología	9
3.1 Estudios previos:	9
3.2 Diseño del estudio	9
3.2.1 Tipo de Estudio	9
3.2.2 Especie animal	9
3.2.3 Tamaño de la muestra	10
3.3 Fases del proyecto	10
3.3.1 Fase I: Primer tiempo quirúrgico.	11
3.3.2 Fase II: Segundo tiempo quirúrgico	14
3.3.3 Fase III: Interpretación de resultados. Evaluación radiológica.	17
4. Consideraciones éticas	19
5. Resultados	20

5.1	Fase I	20
5.2	Fase II	21
5.3	Fase III: Evaluación Radiológica.....	21
5.3.1	Lectura convencional:	21
5.3.2	Índice Cierre defecto óseo y porcentaje defecto óseo.	23
6.	Discusión.....	25
6.1	Técnica De Membrana Inducida (Masquelet) En Conejos	25
6.2	Comparación Grupos.....	25
6.3	Acciones célula madre mesenquimal (MSC) en relación a membrana Masquelet	26
6.4	Medios condicionados producidos por MSC y técnica de Masquelet en humanos	28
7.	Conclusiones y recomendaciones	29
7.1	Conclusiones	29
7.2	Recomendaciones	29
	Bibliografía	30

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
<u>Figura 1:</u> Acciones célula madre mesenquimal	6
<u>Figura 2:</u> Esquema de obtención de un medio condicionado.	7
<u>Figura 3:</u> Pieza anatómica fémur de conejo. Fijador Externo para investigación animal en conejos	10
<u>Figura 4:</u> Procedimiento quirúrgico fase I	11
<u>Figura 5:</u> Resultado Radiológico Post operatorio	13
<u>Figura 6:</u> Recuperación y deambulación del animal con el fijador	13
<u>Figura 7:</u> Esquema metodología	15
<u>Figura 8:</u> Procedimiento quirúrgico fase II	17
<u>Figura 9:</u> Medición Porcentaje de cierre del defecto óseo	18
<u>Figura 10:</u> Hallazgos Radiológicos Grupos de Investigación	22
<u>Figura 11:</u> Efectos célula madre mesenquimal en relación a técnica de Masquelet	27

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
<u>Tabla 1:</u> Complicaciones Fase I	20
<u>Tabla 2:</u> Índice Cierre defecto óseo y porcentaje de cierre defecto óseo por espécimen	23
<u>Tabla 3:</u> Promedios Índice Cierre defecto óseo y porcentaje de cierre defecto óseo por grupos de investigación	24

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
MSC	Célula madre Mesenquimal
PMMC	Polimetilmetacrilato- Cemento óseo
cm	Centímetro
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
TGF	Factor de crecimiento transformante
BMP	Proteína morfogénica ósea

Introducción

El manejo de los defectos óseos continua siendo un reto para el cirujano ortopedista quien a pesar de la introducción de nuevas técnicas quirúrgicas para el manejo de la patología de origen multifactorial, aun se ve limitado en los resultados postoperatorios y funcionales del paciente.

Diferentes técnicas se han utilizado y entre las más utilizadas están las de corticodistracción (Ilizarov) y la transferencia de injertos vascularizados ya que el uso de injertos no vascularizados no se recomienda para lesiones mayores a 6 cm por la reabsorción del mismo.¹ Con la introducción de técnicas de membrana inducida (Masquelet) para el tratamiento de los defectos óseos, utilizando volúmenes variables de injerto óseo autólogo no vascularizado se han descrito reconstrucciones de hasta de 20 cm, por lo que en grandes defectos en los cuales se requieren volúmenes mayores de injerto, se han venido incorporando técnicas quirúrgicas para la obtención del mismo en diferentes localizaciones corporales, aumentando la morbilidad del paciente y el riesgo de complicaciones^{2,3}.

El estudio de las células madre mesenquimales (MSC) ha proporcionado un mejor entendimiento de sus funciones, efectos capacidad de diferenciación y secreción paracrina por lo que se plantea la posibilidad de su utilización dentro del arsenal terapéutico para el manejo de defectos óseos segmentarios. El presente trabajo evalúa de forma experimental la utilización de medios condicionados producto de la secreción paracrina de células madre mesenquimales como alternativa al uso de injerto óseo en el segundo tiempo quirúrgico de la técnica de Masquelet.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar de forma experimental la utilización de medios condicionados producto de la secreción paracrina de células madre mesenquimales como alternativa al uso de injerto óseo en el segundo tiempo quirúrgico de la técnica de Masquelet.

1.2 Objetivos Específicos

- Estudiar los aspectos biológicos y moleculares de la expansión y diferenciación de las células madre mesenquimales in vivo (modelo animal) en la búsqueda de estrategias terapéuticas para tratamiento de defectos óseos estructurales en huesos largos.
- Evaluar la utilidad del uso de medios condicionados producto de la actividad paracrina de la MSC dentro del segundo tiempo quirúrgico técnica de Masquelet para manejo de defectos óseos críticos en huesos largos.
- Evaluar los hallazgos radiológicos del tejido obtenido en área defecto óseo crítico posterior a la utilización de medios condicionados en el segundo tiempo quirúrgico técnica de Masquelet.
- Evaluar desde el punto de vista experimental posibles estrategias terapéuticas para patología osteoarticular basadas en la utilización de células madre y modificación de entornos celulares (citoquinas) y la posible combinación de estas nuevas estrategias

con las ya utilizadas actualmente en el entorno clínico para manejo de defectos osteoarticulares (trasplante de tejido osteoarticular, banco de tejido).

- Incursionar como unidad de investigación en patología ortopédica en el campo de la biología molecular y el uso de células madre con el fin de buscar estrategias terapéuticas en enfermedad degenerativa osteoarticular y en el manejo de defectos óseos estructurales en huesos largos en los cuales las técnicas disponibles actualmente a nivel mundial no solucionan de forma satisfactoria la patología del paciente.

2. Marco Teórico

2.1 Técnica membrana inducida (Masquelet)

Diferentes publicaciones desde 1986 han aumentado el conocimiento de la técnica propuesta por Masquelet para la reconstrucción en dos tiempos quirúrgicos de defectos óseos mediante la inducción de una membrana biológica ⁶. Técnica generalmente utilizada en reconstrucciones traumáticas o post infecciosas.

En el primer tiempo quirúrgico se realiza la remoción del tejido óseo necrótico asociado a la colocación de un espaciador de cemento (Polimetilmetacrilato - PMMC) y la adecuada cobertura en tejidos blandos. El segundo tiempo se realiza entre las 6 y 8 semanas cuando los tejidos blandos tienen una mejoría de signos inflamatorios e infecciosos, momento en el cual se realiza el retiro del espaciador preservando la membrana que lo rodea, la cual se rellena con injerto óseo⁴.

Estudios realizados enfocados al entendimiento del papel de la membrana en la inhibición de la absorción del injerto óseo, han utilizado ovejas como modelo animal, en los cuales se crearon defectos óseos de 3cm y se simularon cuatro situaciones experimentales para el injerto óseo en el segundo tiempo quirúrgico: membrana + injerto, injerto sin membrana, membrana sin injerto y defecto sin membrana y sin injerto, evidenciando la importancia de la membrana en la viabilidad del injerto óseo para la reconstrucción ósea. De forma interesante a pesar de no utilizar sustituto óseo se documentó la formación de hueso al interior de la membrana⁵.

Estudios posteriores se han enfocado en el análisis histológico y bioquímico de la membrana encontrando que la membrana está altamente vascularizada en todas sus capas⁶. La parte interna (cara al cemento) es un epitelio similar a la sinovial y la parte exterior está hecha de colágeno, fibroblastos y miofibroblastos. La membrana secreta factores de crecimiento: alta concentración de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) factor de crecimiento transformante 1(TGF B-1); niveles observados desde la segunda semana. La proteína morfogénica ósea (BMP-2) estaba en su nivel más alto en la cuarta semana.

Como se ha mencionado, con los resultados clínicos y de los estudios experimentales, se puede afirmar que la membrana inducida actúa como una cámara biológica. La membrana evita la reabsorción del hueso esponjoso y promueve la vascularización y la corticalización del hueso esponjoso. Por último, se considera un sistema de entrega in situ para factores de crecimiento y factores osteoinductores. Los estudios realizados a la fecha sugieren que el mejor momento para realizar el injerto es un mes después de la colocación del espaciador cemento.

2.2 Células madre mesenquimales (MSC)

Las células madre mesenquimales (MSC) fueron inicialmente descritas en medula ósea hacia 1970⁶ y actualmente se reconoce su existencia en diferentes tejidos: cordón umbilical, sangre, tejido adiposo, pulmón, cerebro, hígado. Por sus características son foco de investigación como fuente terapéutica para diferentes enfermedades. Tres funciones principales de las células mesenquimales han sido asociadas con sus efectos terapéuticos⁷: remplazo de tejidos a través de diferenciación, inmunomodulación y efectos antiinflamatorios; y por último la secreción de moléculas que estimulan o asisten en el proceso de reparación tisular (efecto paracrino) (Figura 1).

La evidencia actual demuestra su capacidad para diferenciarse hacia líneas celulares provenientes de las tres capas germinativas: hepatocitos (endodermo), osteocitos y miocitos (mesodermo) y neuronas (ectodermo). Sin embargo, en estudios in vivo, las MSC son células de vida corta después de su inyección siendo detectables en los tejidos

durante periodos variables entre las 48 horas hasta tres meses⁸. Hallazgos por los cuales la diferenciación hacia tejidos células específicos han tomado un segundo plano y se estudian sus efectos paracrino e inmunomodulares como posibles fuentes dentro de la tecnología de tejidos.

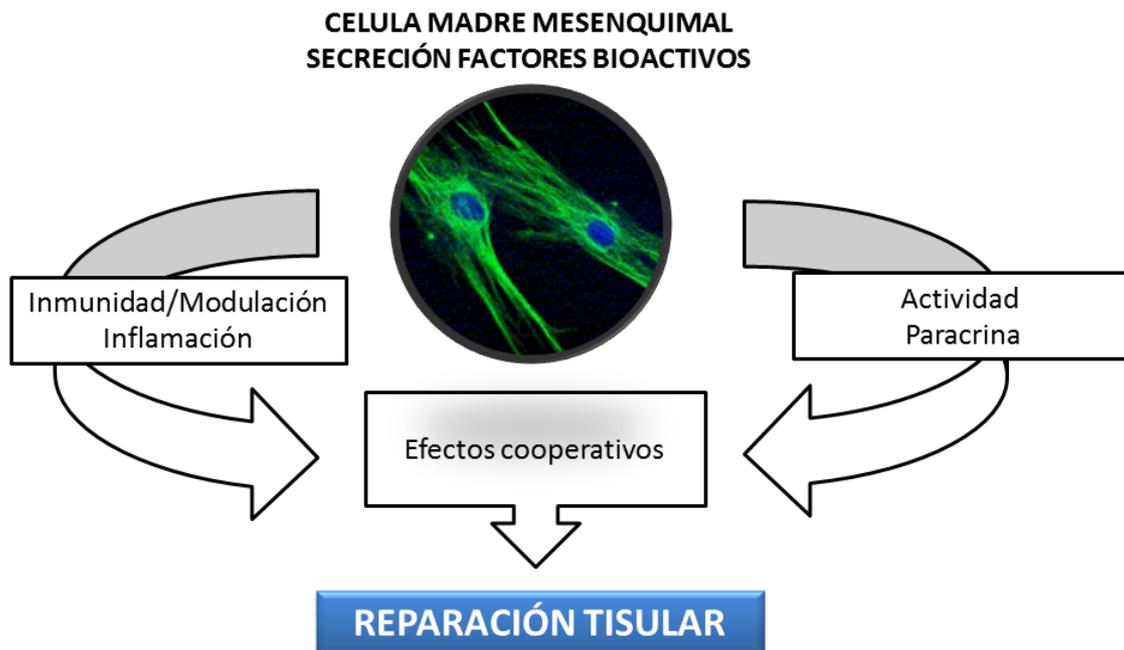


Figura 1: Acciones MSC

El efecto paracrino descrito para las MSC postula que los factores de crecimiento, factores neurotróficos, citoquinas y moléculas de señalización secretadas por las MSC, son suficientes para ejercer efectos terapéuticos al activar vías que promueven la angiogenesis y regeneración tisular e inhibir la fibrosis, apoptosis e inflamación⁹. Gracias a esta propiedad de las MSC, a nivel experimental se obtiene el Medio Condicionado enriquecido con factores de crecimiento y moléculas de señalización secretados por estas células in vitro (Figura 2)¹⁰. Dentro de las proteínas identificadas se resaltan el factor de crecimiento de hepatocitos (Hepatocyte Growth Factor, HGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (Brain Derive Neurotrophic Factor, BDNF), el factor de crecimiento vasculoendotelial (Vascular 2 Endotelial Factor Growth Factor, VEGF) y la interleuquina 6 (Interleukin, IL6). El grupo de investigación Biología de Células Madre de la Universidad

Nacional, ha demostrado la presencia de factores proangiogénicos e inmunomoduladores como HGF, BDNF, VEGF, SDF-1, TGF- α y β FGF entre otros, que promueven la migración, proliferación y supervivencia celular¹¹.

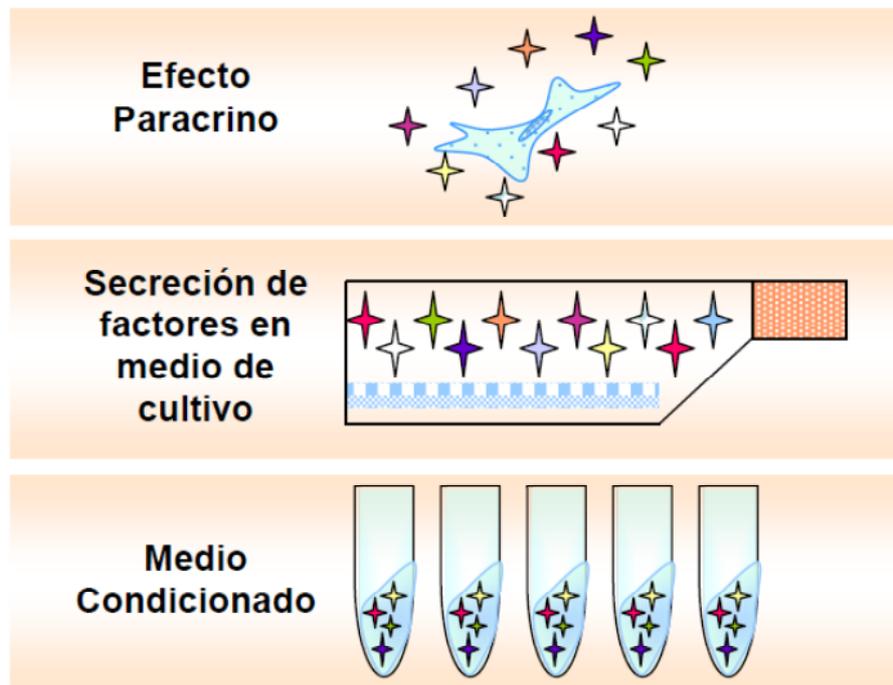


Figura 2. Esquema de obtención de un medio condicionado. Las MSC gracias a su efecto paracrino, secreta factores de crecimiento y moléculas de señalización al medio que utiliza para su crecimiento. De esta manera tras un cultivo in Vitro se puede obtener el medio condicionado enriquecido con las proteínas secretadas por las MSC. Tomado de: Núñez Ríos, Diana Leandra. Evaluación del efecto de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y de medios condicionados en la recuperación motora de ratas con lesión medular. Maestría tesis, Universidad Nacional de Colombia. 2010

Las MSC son candidatas ideales para la medicina regenerativa, ya que pueden ser obtenidas fácilmente de los tejidos utilizados actualmente en contextos clínicos, tales como la médula ósea, sangre del cordón umbilical y tejido adiposo. También pueden ser ampliados en cultivos para proporcionar un número suficiente para el uso clínico. Además, poseen inmunogenicidad baja, probablemente debido a una falta de HLA-DR y baja expresión de HLA-1, por lo cual no se requiere la búsqueda de HLA lo que amplía su utilidad potencial¹².

Olli-Matti de la Universidad Oulu en Finlandia, publica su artículo titulado *The mechanism of Action of Induced Membranes in Bone Repair*¹³, en el cual evalúan la influencia de la membrana inducida en la diferenciación de la célula mesenquimal hacia línea osteoblastica recreando un ambiente libre de glucocorticoides, b-glicerofosfato y ascorbato los cuales son conocidos inductores in vitro de las células mesenquimales hacia osteoblastos. Los autores refieren que al cultivar de forma conjunta la membrana con la célula mesenquimal, puede observarse hacia las cuatro semanas en las células cosechadas, actividad de fosfatasa alcalina específica y concentración de calcio en las células mesenquimales, indicadores de la actividad formadora de hueso. En la misma publicación se evalúa el tiempo de longevidad de la membrana como osteoinductora refiriendo mayor capacidad para producir señales químicas citotácticas a las 4 semanas con respecto a las membranas de 8 semanas, datos en relación a la actividad de la fosfatasa y niveles de calcio.

2.3 El futuro de la técnica de membrana inducida

La técnica aún se encuentra en desarrollo y es evidente su impacto clínico en los procesos de reconstrucción¹¹. Cuando se emplea un aloinjerto u otro sustituto óseo, el promedio ideal de este en relación al hueso autólogo requerido durante el segundo tiempo quirúrgico aún no está bien definido; por lo que se debe considerar posibles modificaciones en el proceso de consolidación y en las propiedades mecánicas dentro de la membrana. Preguntas que necesitan ser respondidas incluyen cuál es el mejor elemento osteoconductor y osteoinductor. Adicionalmente, las propiedades osteoinductoras de la membrana pueden no ser suficientes, por lo que el injerto puede asociarse con factores osteoinductores o células osteoprogenitoras para mejorar la formación del hueso¹⁴.

Con el progreso en el conocimiento de las MSC asociado a una mayor comprensión de la función y los efectos de la misma, de sus capacidades de diferenciación y paracrinas, se plantea la posibilidad de su uso dentro del arsenal terapéutico para el manejo de defectos óseos segmentarios.

3. Metodología

3.1 Estudios previos:

Se adelantó una búsqueda en diferentes bases de datos electrónicas (EMbase, PubMed, Science Direct, Scielo) utilizando los términos: Masquelet, Induced Membrane, Mesenchymal Stem Cell y el términos MESH: cell, mesenchymal stem, unidos por conectores booleanos AND, OR sin encontrar ninguna referencia bibliográfica en el cual se combinaran las dos técnicas para la reconstrucción ósea en huesos largos tanto en modelo animal como en experimentación clínica.

3.2 Diseño del estudio

3.2.1 Tipo de Estudio:

Estudio experimental en modelo animal.

3.2.2 Especie animal:

Conejos de raza nueva Zelanda peso entre 2000 y 3000 gramos. La selección de la especie, raza y peso se fundamentan en trabajos previos, donde se ha demostrado la posibilidad de inducción de membrana y se ha evaluado las características histológicas de la misma, resultados que han sido similares a los observados en estudios humanos^{15, 16}.

En simulaciones experimentales previas por dos del autor aun sin publicar, donde se evaluaron los tamaños de fémur y tibia de conejo con el fin de determinar que pieza anatómica permitiría dos puntos importantes para la realización del modelo experimental: facilidad técnica para la realización de la osteotomía y facilidad técnica para la colocación de un fijador externo, se escogió al fémur como pieza anatómica. Asimismo, teniendo en

cuenta como referencia estudios previos sobre fijación externa en modelos animales^{17,18,19}. y los datos obtenidos del estudio anatómico de las piezas de conejo se realizaron el diseño y pruebas del *fijador externo para investigación animal en conejos* (proceso actual de patente). (Figura 3).



Figura 3: Pieza anatómica fémur de conejo. Fijador Externo para investigación animal en conejos.

3.2.3 Tamaño de la muestra

Se plantearon cuatro grupos de comparación para lo cual se define una muestra de 10 conejos.

3.3 Fases del proyecto

Se realizó un proceso de investigación de tres fases, las dos iniciales correspondientes a la intervención experimental en el modelo animal propuesto y una tercera fase de evaluación, la cual finalizó con la ejecución de los documentos para publicación y divulgación ante sociedades científicas en el ámbito nacional e internacional.

3.3.1 Fase I: Primer tiempo quirúrgico.

Durante esta fase todos los conejos fueron llevados a un primer tiempo quirúrgico con las siguientes características (Figura 4, 5, 6).

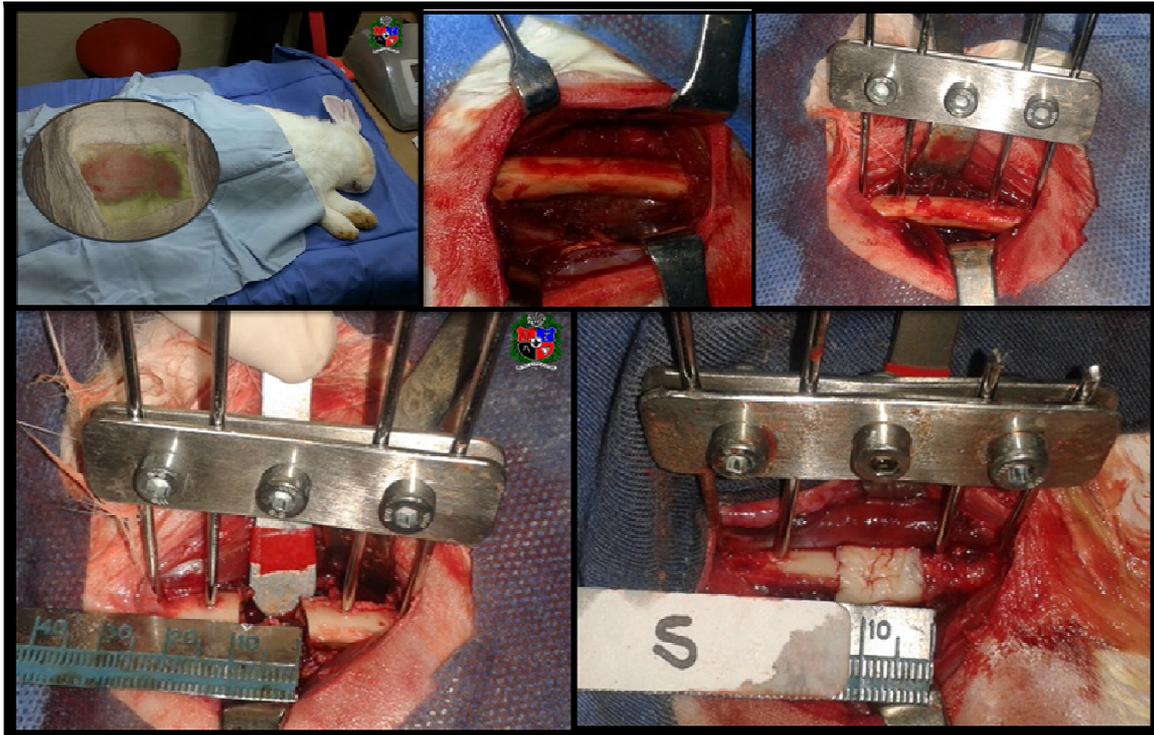


Figura 4. Procedimiento quirúrgico fase I

1. Neuroleptoanestesia (Xilacina, Rompún BAYER® 6 mg/kg y Ketamina IMALGENE® 70 mg/kg por cada animal).
2. Preparación de la extremidad inferior derecha para realización de procedimiento quirúrgico (Rasurado).
3. Asepsia y antisepsia de campo operatorio con clorhexidina. Colocación de campos quirúrgicos estériles

12 Modificación experimental de la técnica de membrana inducida (Masquelet) mediante uso de medios condicionados producidos por células madre mesenquimales

4. Incisión longitudinal sobre cara lateral sobre muslo, disección tejido celular subcutáneo, apertura de fascias y musculatura hasta exposición del fémur.
5. Colocación de 4 clavos de Steinmann de 1.8 mm roscados bicorticales.
6. Montaje de fijador externo.
7. Realización de defecto óseo de 1 cm (defecto óseo crítico) y resección de periostio en área ósea expuesta .
8. Colocación de espaciador de cemento PMMC. Preparación intraquirúrgica bajo técnica estéril sobre área de defecto óseo.
9. Lavado de campo quirúrgico con solución salina.
10. Cierre de fascia y piel. Colocación de gasas alcoholadas sobre heridas quirúrgicas.
11. Toma de radiografía posoperatoria de cada uno de los especímenes operados.
12. Posoperatorio inmediato con esquema de antibiótico durante 5 días con cefalexina y analgesia con ketoprofeno.
13. Seguimiento de cada uno de los animales hasta completar el día 30, registrando posibles complicaciones como infección, aflojamiento del fijador externo o muerte de los especímenes.

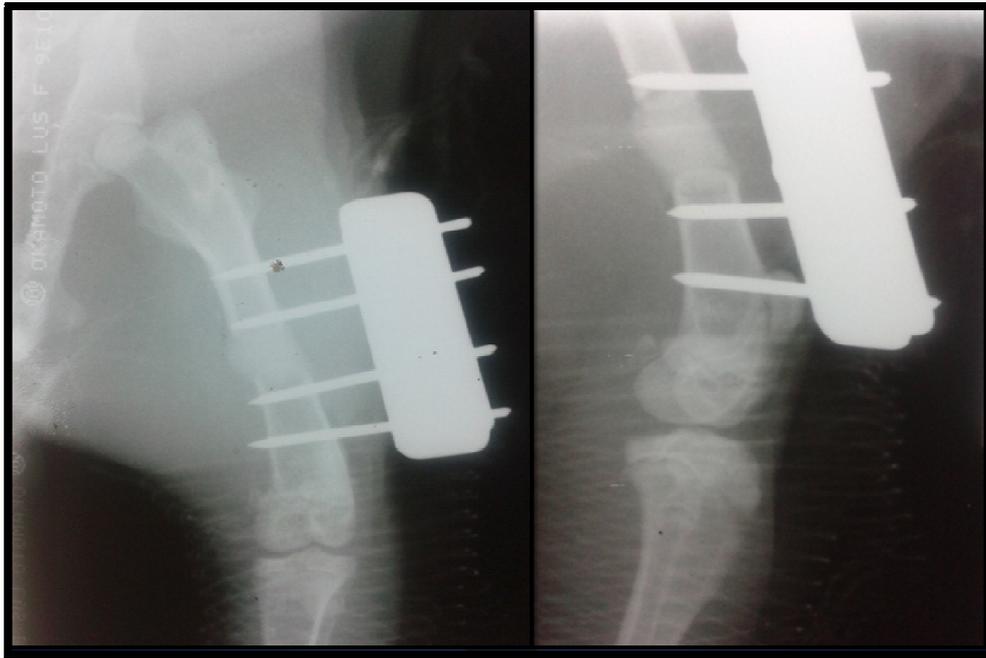


Figura 5: Resultado Radiológico Post operatorio.



Figura 6: Recuperación y deambulaci3n del animal con el fijador.

3.3.2 Fase II: Segundo tiempo quirúrgico

Durante la fase I se presenta la muerte de uno de los especímenes disminuyendo la muestra a 9 conejos (Ver resultados fase I).

Para la fase II se definen cuatro grupos, (Figura 7): un grupo con aplicación de células madre en la zona de la membrana, un grupo para colocación de medios condicionados y dos grupos de control, el primero utilizando únicamente la matriz de fibrina (hidrogel), medio de suspensión del volumen de células madre y medios condicionados empleado; y un último grupo de control negativo sin ningún elemento colocado al interior de la membrana. Para la elaboración del hidrogel se realiza la mezcla de: Plasma 830µL, Solución salina normal 1330 µL, Acido Tranexámico 16 µL, DMEM 166 µL (o volumen similar de MSC en caso de utilización de las mismas), CaCl₂ 166 µL. Volumen total de 2,5 mL. Esta matriz permanece en estado líquido aproximadamente 10 minutos después de su preparación su manipulación en el procedimiento quirúrgico.

Para la preparación del hidrogel con medios condicionados se utilizaron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano con un 80% de confluencia, las cuales fueron lavadas 3 veces con PBS pH 7.4 (GIBCO™) para eliminar restos de DMEM + SFB 10%. Posteriormente se adicionó 3ml de medio libre de suero bovino fetal (Opti-MEM® marca GIBCO™) con penicilina 100U/mL, estreptomycin 100µg/mL y se cultivo por 24h a 37°C, con una atmósfera de dióxido de carbono (CO₂) al 5%. Pasadas las 24h se recuperó el medio de cultivo y se centrifugó a 3000g por 10min en centrifuga refrigerada para eliminar restos celulares. Finalmente se adicionó un coctel de inhibidores de proteasas, se realizaron las diluciones necesarias para que todos los medios condicionados quedaran a la misma concentración de proteína total (134µg/mL, cuantificada con el método de Bradford) y se almacenó a -20°C hasta el día de su implementación.

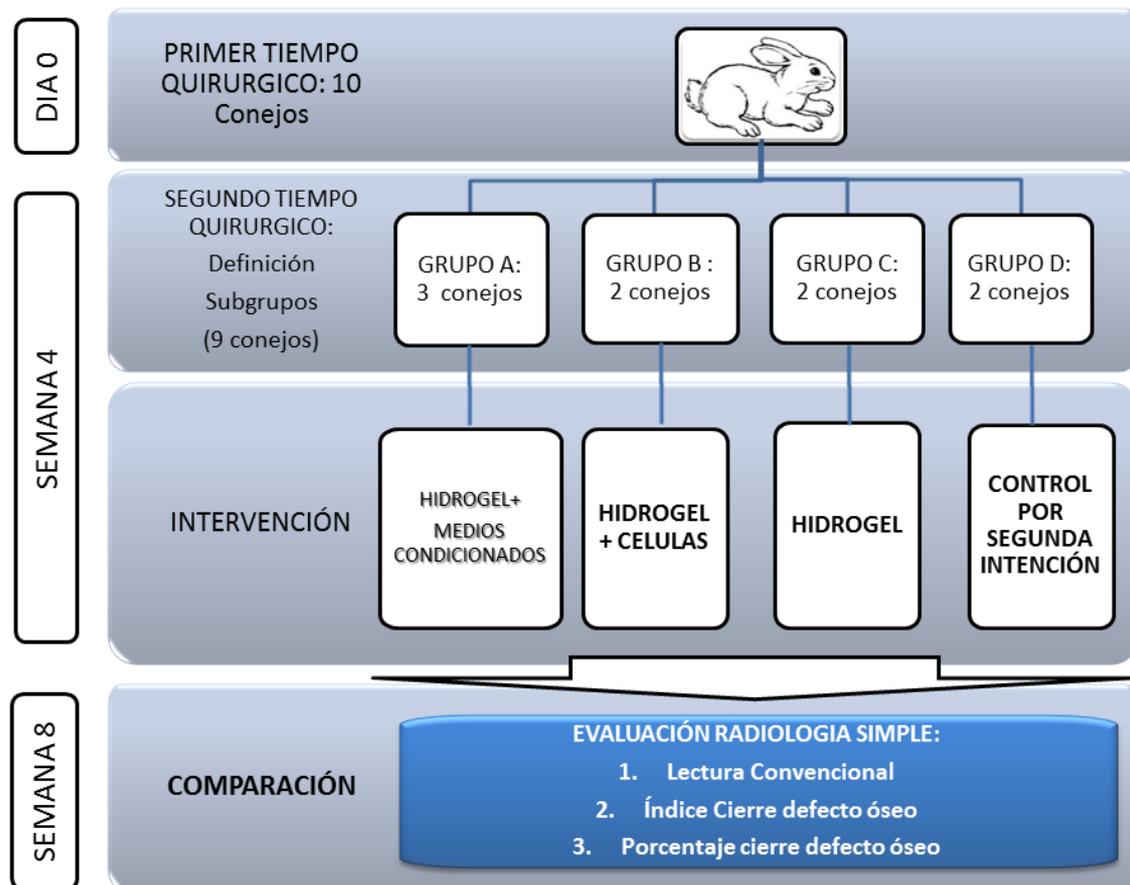


Figura 7: Esquema metodología.

Los 9 conejos fueron sometidos a un segundo procedimiento quirúrgico previa aleatorización en cada uno de los grupos descritos siguiendo el siguiente protocolo (Figura 8):

1. Neuroleptoanestesia (Xilacina, Rompún BAYER® 6 mg/kg y Ketamina IMALGENE® 70 mg/kg por cada animal).
2. Preparación de la extremidad a intervenir siguiendo el mismo protocolo de asepsia y antisepsia utilizado en la fase I.

16 Modificación experimental de la técnica de membrana inducida (Masquelet) mediante uso de medios condicionados producidos por células madre mesenquimales

3. Incisión longitudinal sobre cara lateral sobre muslo a través de incisión quirúrgica previa, disección tejido celular subcutáneo, apertura de fascias y musculatura hasta exposición del fémur.
4. Identificación de la membrana y apertura longitudinal de la misma.
5. Retiro de PMMC preservando membrana.
6. Según la aleatorización correspondiente a cada conejo se coloca al interior de la membrana la intervención a comparar:
 - a. Hidrogel con medios condicionados (DMEM: medio de cultivo con citoquinas secretadas por MSC, no contiene células).
 - b. Hidrogel con Células Madre Mesenquimales.
 - c. Hidrogel
 - d. Control Negativo.
7. Cierre de Membrana con sutura absorbible.
8. Lavado de Campo quirúrgico con solución salina.
9. Cierre de fascia y piel. Colocación de gasas alcoholadas sobre heridas quirúrgicas.
10. Seguimiento posoperatorio de cada uno de los animales hasta el día 30, registrando posibles complicaciones como infección, aflojamiento del fijador externo o muerte de los especímenes.

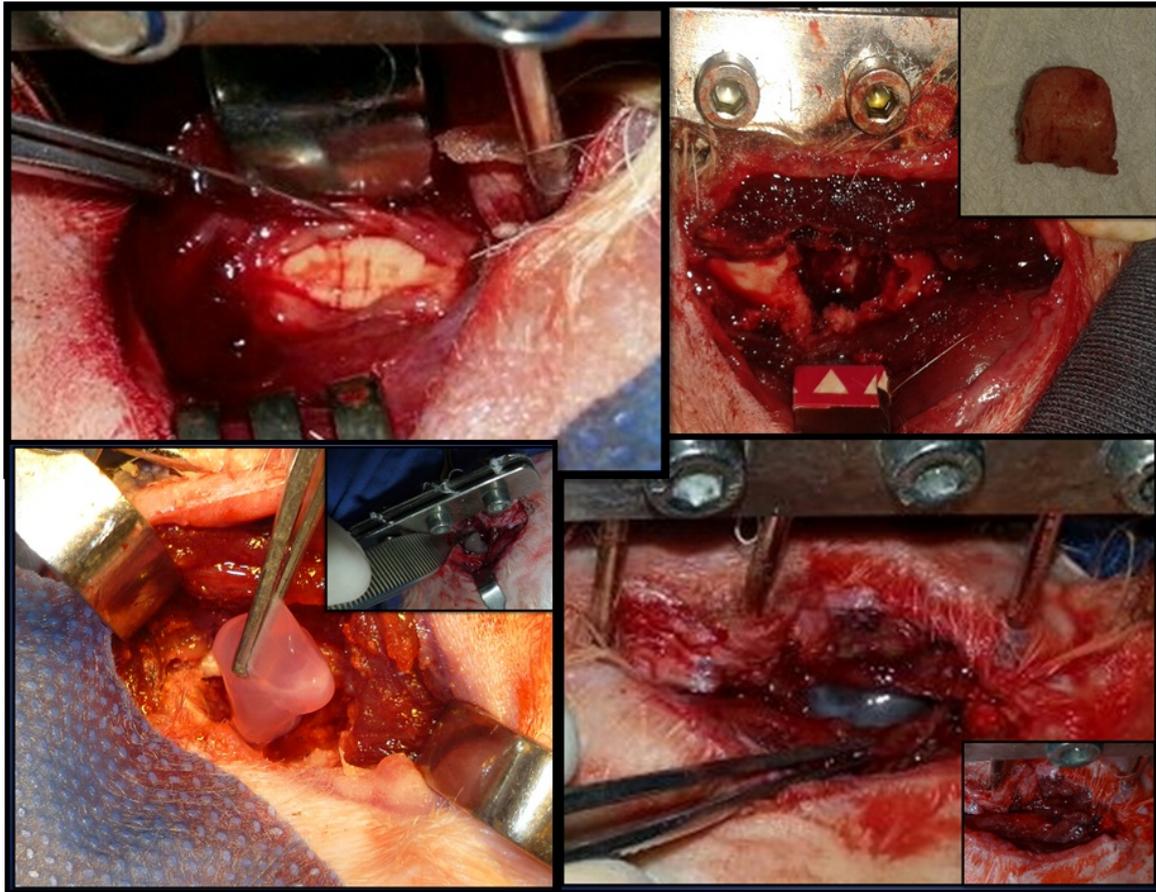


Figura 8: Procedimiento quirúrgico fase II.

3.3.3 Fase III: Interpretación de resultados. Evaluación radiológica.

:

El día 30 postquirúrgico a la Fase II, se realizó evaluación radiológica de cada uno de los especímenes para comparar los cambios imagenológicos secundarios a cada una de las intervenciones, para lo cual se tomaron proyecciones anteroposterior (AP) y laterales del segmento anatómico, correspondiente al muslo de cada conejo previamente intervenido. Cada imagen fue digitalizada para su posterior análisis. Las radiografías digitalizadas para cada muestra se analizaron de manera estándar con la finalidad de comparar la calidad del regenerado óseo y las características del mismo en cada uno de los grupos de intervención.

En cada zona de defecto, se utilizó la siguiente escala ordinal de 4 puntos para comparar la cantidad de tejido formado en la zona de Masquelet:

1. = no hay formación de hueso en defecto
2. = densidad es menor que el hueso adyacente
3. =densidad es mayor o igual al hueso adyacente, formación de dos corticales (sumadas en proyección AP y lateral)
4. =densidad es mayor o igual a la densidad del hueso cortical adyacente con formación de tres o más corticales sumadas en las dos proyecciones²⁰.

En la proyección lateral, el segmento correspondiente al defecto óseo y de la diáfisis proximal y distal al defecto, fue dividido en segmentos de 1x1mm para evaluar en cada uno de los animales, el porcentaje de cierre del defecto óseo; sustrayendo del área total del defecto (100%), el porcentaje de área radiolúcida en la zona de osteotomía (Figura 9).

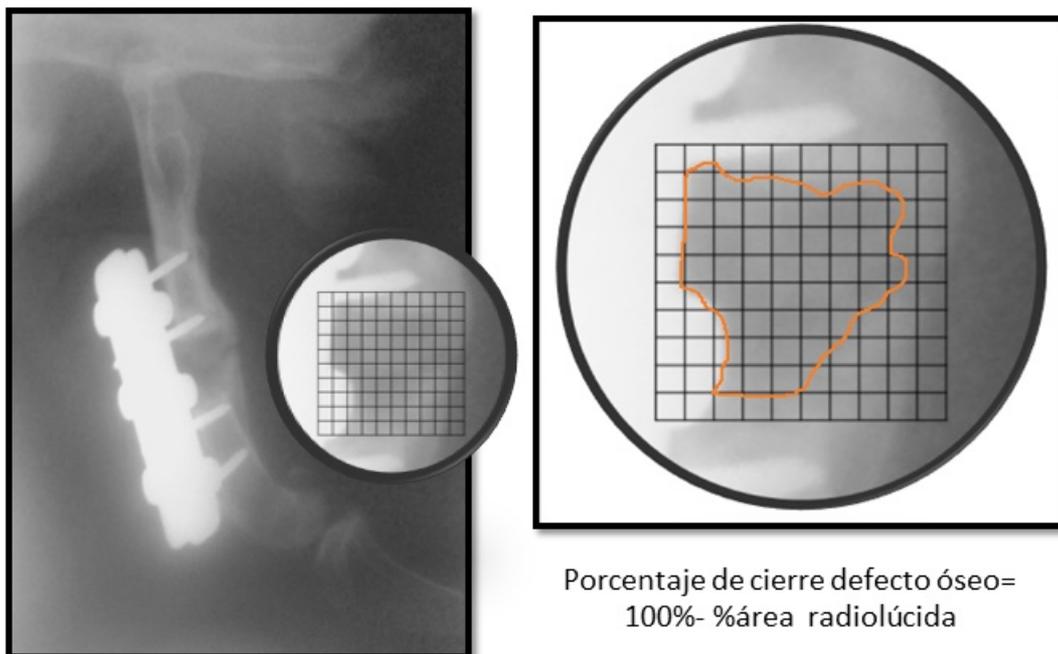


Figura 9: Medición Porcentaje de cierre del defecto óseo

4. Consideraciones éticas

Este estudio se realiza dentro de las normas éticas y los principios de bioética sugeridos por la UNESCO y la ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD para la experimentación en animales. Y la normatividad nacional descrita para tal fin incluida en la Ley No. 84 de 1989. "Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales", con especial énfasis al Capítulo Sexto: *Del Uso de Animales Vivos en Experimentos e Investigación*. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad Nacional, por lo que se aplicaron todas las normativas de las 3 R de Russell y Burch²¹.

La investigación y los aportes que esta pueda generar son avalados por el grupo de investigación y su propiedad intelectual será determinada de acuerdo con la ley y los reglamentos expedidos por la universidad a este respecto; así mismo la autoría del presente trabajo será de los investigadores relacionados en la ficha inicial.

5. Resultados

5.1 Fase I

Durante la fase I se intervinieron 10 conejos siguiendo el protocolo previamente establecido sin presentarse complicaciones intraquirúrgicas. Se presentó una complicación postquirúrgica mayor dada por fractura a través de los clavos del fijador, ocasionando un aflojamiento del sistema. Ante el deterioro clínico del espécimen animal se decidió la eutanasia.

No se documentaron infecciones del sitio operatorio en ninguno de los animales operados. Las complicaciones durante la fase I se resumen en la tabla I. 9 conejos lograron deambular y desplazarse de forma permanente sin documentarse fallas del fijador (Figura 5).

COMPLICACIONES	Intraquirúrgicas	0	
	Fracturas	1	Fractura a través de clavos
	Aflojamiento fijador	1	
	Infecciones	0	
	Muerte	1	Conejo con falla de fijador
	Total	2	
Conejos para fase II		9	

Tabla I. Complicaciones Fase I

5.2 Fase II

Durante la fase II se intervinieron 9 conejos siguiendo el protocolo previamente establecido sin presentarse complicaciones intraquirúrgicas ni postquirúrgicas. No se documentaron infecciones del sitio operatorio en ninguno de los animales operados.

5.3 Fase III: Evaluación Radiológica

5.3.1 Lectura convencional:

Se realizó evaluación de todas las radiografías encontrando en todos los animales de experimentación formación ósea a nivel del defecto. En todos los animales se observó formación de cortical posterior. Al evaluar los hallazgos por grupos fue evidente la formación y cierre del defecto en los animales que se utilizó la técnica de Masquelet modificada mediante el uso de medios condicionados (Fig. 10A), así como en aquellos que se utilizaron células madre mesenquimales (Fig.10B). En el grupo de control con hidrogel se documentó tendencia hacia la pseudoartrosis a nivel del defecto óseo y pérdida de la continuidad de la cortical posterior (Fig. 10C), mientras que en el grupo con cierre por segunda intención o sin uso de injerto óseo, se evidenció escasa formación de tejido óseo a nivel del defecto (Fig. 10D).

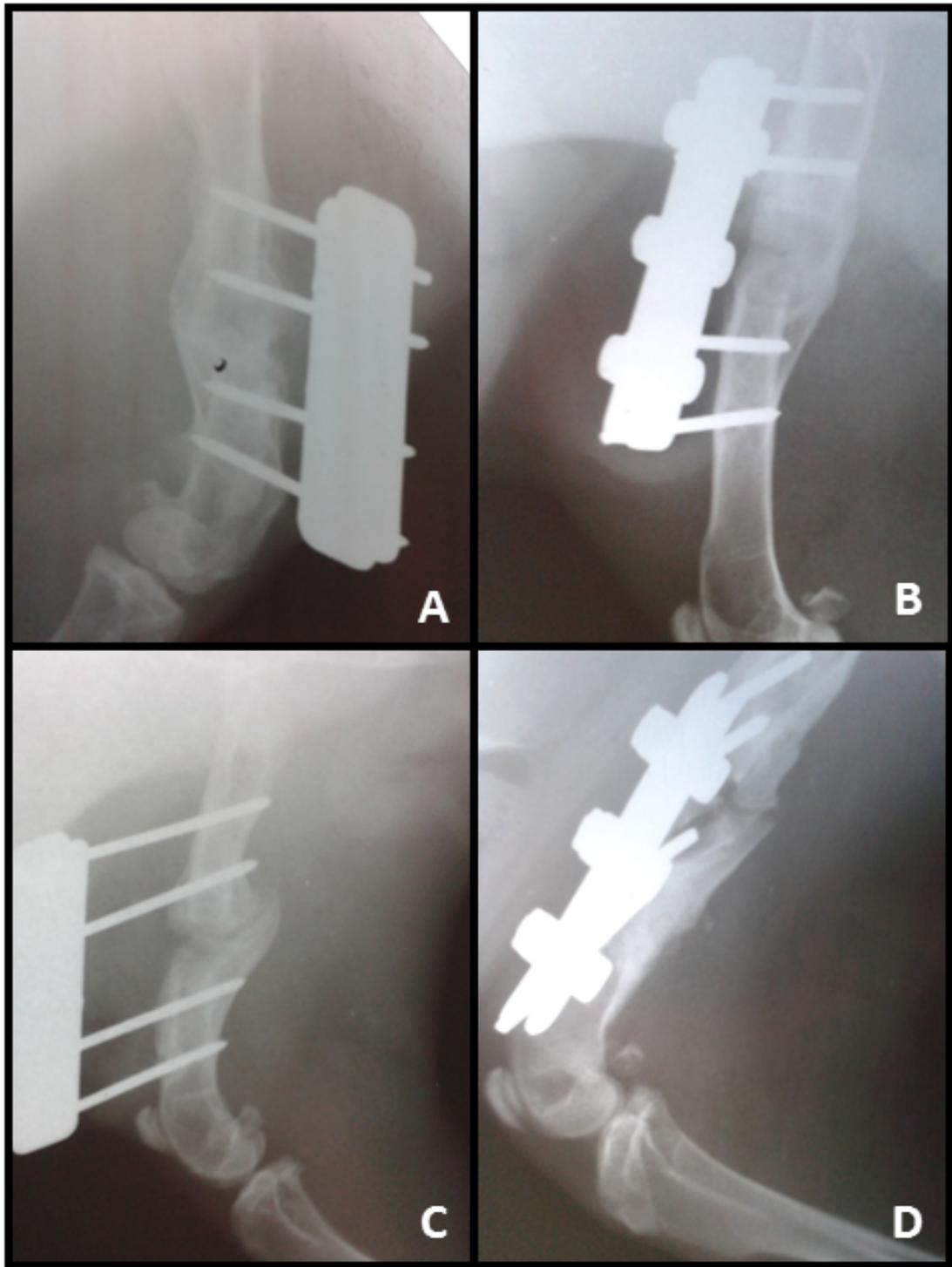


Figura 10. Hallazgos Radiológicos Grupos de Investigación. A: Hidrogel+ Medios Condicionados. B: Hidrogel + Células Madre Mesenquimales. C: Hidrogel. D. Control: Cierre por segunda intención.

5.3.2 Índice Cierre defecto óseo y porcentaje defecto óseo.

Se realizó valoración del índice radiológico y porcentaje de cierre del defecto óseo en cada uno de los animales de experimentación por parte del grupo investigador. Los resultados de la valoración se consignan en la Tabla 2. Adicionalmente se realizaron promedios para cada uno de los grupos los cuales se consignan en la Tabla 3.

	INDICE CIERRE DEFECTO ÓSEO				PORCENTAJE DE CIERRE DEL DEFECTO
	1	2	3	4	
INTERVENCIÓN POR CONEJO	No hay formación de hueso en defecto	Densidad es menor que el hueso adyacente	Densidad es mayor o igual al hueso adyacente, formación de dos corticales (sumadas en proyección AP y lateral)	Densidad es mayor o igual a la densidad del hueso cortical adyacente con formación de tres o más corticales sumadas en las dos proyecciones.	
1: Hidrogel+ Medios Condicionados				X	98%
3: Hidrogel		X			60%
4: Hidrogel+ Medios Condicionados				X	100%
5: Hidrogel+ Medios Condicionados			X		92%
6: Hidrogel + Células			X		80%
7: Hidrogel		X			55%
8: Hidrogel + Células			X		75%
9: Control Segunda Intención		X			35%
10: Control Segunda Intención	X				45%

Tabla 2. Índice Cierre defecto óseo y porcentaje de cierre defecto óseo por espécimen.

PROMEDIOS MEDICIÓN RADIOLÓGICA		
	<i>Índice De Cierre Del Defecto</i>	<i>Porcentaje De Cierre</i>
HIDROGEL	2	58%
HIDROGEL+ MEDIOS CONDICIONADOS	3,6	97%
HIDROGEL + CELULAS	3	78%
CONTROL SEGUNDA INTENCION	1,5	40%

Tabla 3. Promedios Índice Cierre defecto óseo y porcentaje de cierre defecto óseo por grupos de investigación.

6. Discusión

6.1 Técnica De Membrana Inducida (Masquelet) En Conejos

Con el presente trabajo se reprodujo la técnica de Masquelet en conejos para la formación adecuada de la membrana, su preservación y como suturarla durante el segundo tiempo quirúrgico, actuando como contenedor del hidrogel realizado con plasma humano, que sirvió como vehículo de transporte de células y citoquinas producidas por la célula madre mesenquimal.

Uno de los principales problemas durante la reproducción de la técnica es la estabilidad y la alineación de los segmentos óseos posterior a la creación del defecto óseo. Motivo por el cual se desarrolló un fijador externo para el segmento anatómico escogido, que presentó baja tasa de complicaciones, soportó las exigencias biomecánicas secundarias a la movilización y brindó soporte a la descarga de peso temprana sobre la extremidad, en un animal con actividad física permanente en el postquirúrgico inmediato.

La técnica de Masquelet es reproducible en modelos animales y para su estudio han sido utilizadas diferentes especies. En conejos se ha empleado para reconstrucción mandibular posterior a mandibulectomía bilateral¹⁶. Para los autores, este es el primer trabajo del cual tienen conocimiento en el que se utiliza la técnica para reconstrucción de huesos largos en la especie seleccionada; así mismo, es el primer trabajo en la literatura mundial en el cual se utilizan medios condicionados producidos por MSC para regeneración de tejido óseo en huesos largos, como posible estrategia para modificar la técnica de Masquelet.

6.2 Comparación Grupos

Al revisar la literatura se decidió usar un defecto óseo crítico de 1cm, realizando una hemidiafisectomía del segmento anatómico con el fin de no conseguir curación espontánea²². En la especie utilizada un defecto de 1cm, corresponde al 25% del total de la diáfisis del fémur.

Con el objetivo de no emplear injerto óseo durante el segundo tiempo quirúrgico posterior a la documentación y preservación de la membrana, se optó por la utilización de medios condicionados producidos por células madre mesenquimales, lo cual permitió comparar esta intervención con la utilización de MSC y dos grupos control. No se comparó con la utilización de injerto autólogo de la especie con el fin de no aumentar la morbilidad en la especie de experimentación.

Al evaluar los hallazgos obtenidos en los grupos control hidrogel y cierre por segunda intención (como se denominó al grupo en el cual no se colocó ningún tipo de sustancia dentro de la membrana, preservando esta última), se confirma la capacidad osteoinductora de la membrana aún en casos de ausencia de injerto óseo, eventos ya previamente descritos por otros autores⁵.

A partir de los resultado de los grupos de intervención con células madre y el grupo en el cual se colocó dentro de las membranas las citoquinas producidas por la célula mesenquimal embebidas en plasma, se demuestra que la capacidad osteoinductora de la membrana se aumenta en relación a grupos de control, logrando un cierre del defecto casi del 100% sin la utilización de injerto óseo.

6.3 Acciones célula madre mesenquimal (MSC) en relación a membrana Masquelet

Al confrontar los dos grupos principales del estudio se pretendía evaluar las posibles vías de acción de la célula mesenquimal dentro de la membrana (Figura 11). En el grupo de

Medios condicionados (citoquinas y factores de crecimiento depositados por la MSC dentro de su microambiente), el principal efecto evaluado fue la actividad paracrina, mientras que al depositar las células a nivel del defecto óseo lo que se pretendió fue buscar establecer su diferenciación hacia la línea osteoblástica secundaria al estímulo osteoinductor de la membrana. Los hallazgos encontrados sugieren que el efecto paracrino de la MSC favorece el crecimiento óseo dentro de la membrana sin la necesidad de injerto óseo y es superior al efecto producido por la diferenciación celular, posiblemente secundario a la vida media variable de la MSC que puede ser de días o semanas⁷.

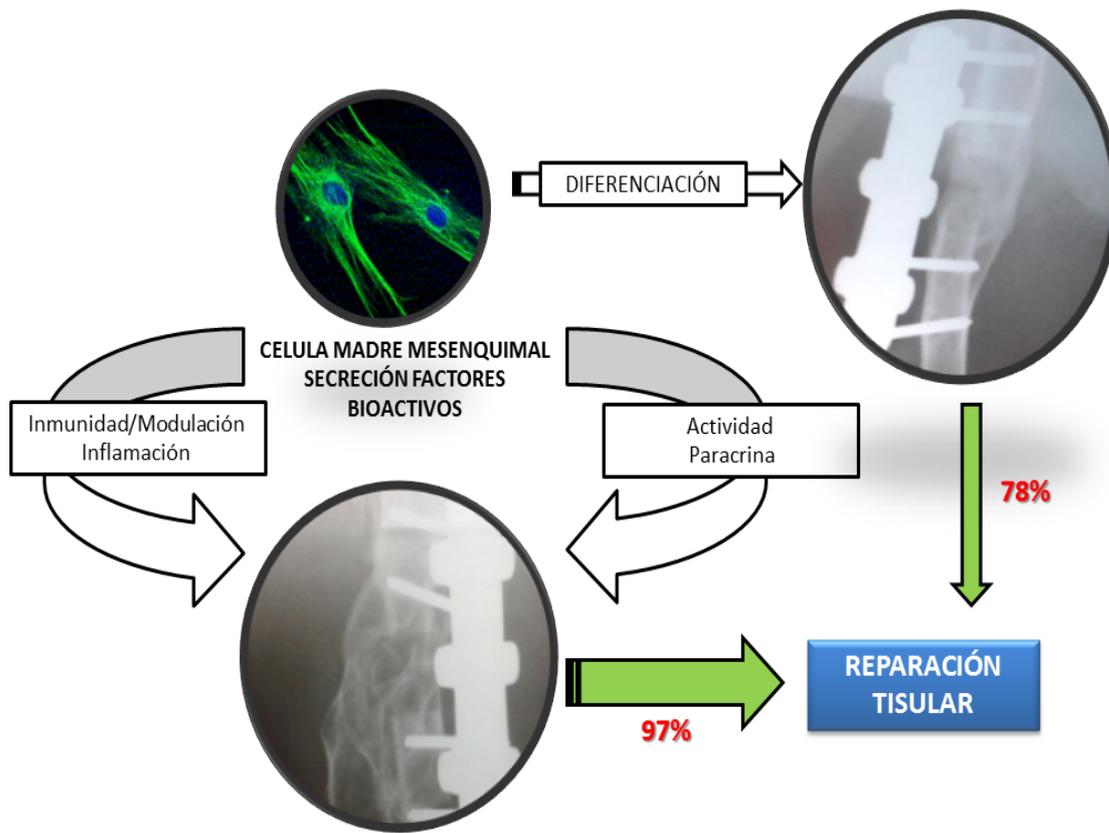


Figura 11. Efectos célula madre mesenquimal en relación a técnica de Masquelet.

6.4 Medios condicionados producidos por MSC y técnica de Masquelet en humanos

Con el auge de la técnica y su aplicabilidad clínica para el manejo de defectos óseos segmentarios en extremidades se requieren grandes volúmenes de injerto óseo y el debate con respecto a la relación aloinjerto vs autoinjerto aún no está esclarecida, sin embargo, aún continua siendo el estándar de oro para la técnica la utilización de injerto autólogo. Es primordial la búsqueda de estrategias de optimización del volumen de injerto en caso de defectos extensos o de nuevos elementos que sustituyan el requerimiento del mismo con el fin de disminuir las comorbilidades secundarias a procedimientos quirúrgicos adicionales.

Los medios condicionados embebidos en hidrogel se plantean como una alternativa económica y de fácil elaboración, ya que pueden ser sintetizados en laboratorio con baja complejidad tecnológica, en comparación con los altos costos secundarios a la realización de procedimientos quirúrgicos adicionales o la utilización de otras fuentes de sustitutos o de proteínas recombinantes.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

- Es posible la utilización de medios condicionados producidos por células madre mesenquimales, basado en su efecto paracrino, como alternativa al injerto óseo durante el segundo tiempo quirúrgico en la técnica de Masquelet en conejos para el tratamiento de defectos óseos en huesos largos.
- La principal limitación del estudio radica en el pequeño tamaño de la muestra de animales de experimentación.

7.2 Recomendaciones

Los hallazgos encontrados plantean una alternativa para el tratamiento de defectos óseos en huesos largos y posible modificación de la técnica de Masquelet. Estos hallazgos deben ser evaluados con nuevos estudios en los cuales se aumente la muestra estudiada. Adicionalmente es importante la realización de estudios de seguridad en humanos para iniciar estudios clínicos.

Bibliografía

¹DeCoster T, Management of Posttraumatic Segmental Bone Defects. *J Am Acad Orthop Surg* 2004;12:28-38.

²Wenisch S, Trinkaus K, Hilda A, Hose D, Herde K, Heiss C, et al. Human reaming debris: asource of multipotent stem cells. *Bone* 2005; 36 (1): 74-83

³ Benjamin C. Taylor, MD, et al. Induced Membrane Technique for Reconstruction To Manage bone Loss. *J Am Acad Orthop Surg* 2012;20: 142-150

⁴ Masquelet A, , Begue T, The Concept of Induced Membrane for Reconstruction of Long Bone Defects. *Orthop Clin N Am* 2010; 41; 27–37.

⁵ Klaue K, Anton C, Knothe U, et al. Biological implementation of “in situ” induced autologous foreign body membranes in consolidation of massive cancellous bone grafts. *J Bone Joint Surg* 1993; 79B(Suppl II):236.

⁶ Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Latsinik N.V., Panasyuk A.F., Borok I.V., Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Transplantation* 1974; 17: 331-340.

⁷. Lavoie J, Uncovering the secretes of mesenchymal stem cells. *Biochimie* 2013; 1-10.

⁸ Eggenhofer E., Benseler V., Kroemer A., Popp F.C., Geissler E.K., Schlitt H.J., Baan C.C., et al. Mesenchymal stem cells are shortlived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol.* 2012; 3; 297.

-
- ⁹ Chen, L.; Tredget, E. E.; Wu, P. Y. *et al.* Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008. **3**(4): e1886.
- ¹⁰ Núñez Ríos, Diana Leandra. Evaluación del efecto de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y de medios condicionados en la recuperación motora de ratas con lesión medular. Maestría tesis, Universidad Nacional de Colombia. 2010.
- ¹¹ Restrepo, S. Secreción de factores angiogénicos en condiciones de normoxia e hipoxia en células stem mesenquimales humanas derivadas de médula ósea y tejido adiposo. Maestría en Microbiología. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. 2009.
- ¹² Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol*. 2003; **31** ; 890-896.
- ¹³ Olli-Matti A, *et al.* The mechanism of Action of Induced Membranes in Bone Repair. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;**95**:597-604
- ¹⁴ Giannoudis P, *et al.* Masquelet technique for the treatment of bone defects: Tips-tricks and future directions. *Injury, Int. J. Care Injured* 2011; **42**; 591–598.
- ¹⁵ Bagliardelli A. Valor de la utilización de espaciadores de cemento y aloinjerto con antibiótico para reconstruir defectos óseos infectados. Estudio experimental en conejos. *Rev Asoc Argent Ortop Traumatol* 2010; (**76**);133-140.
- ¹⁶ Zwetyenga N, Catros S, Emparanza A, Deminiere C, *et al.* Mandibular reconstruction using induced membranes with autologous cancellous bone graft and HA-βTCP: animal model study and preliminary results in patients. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2009; **38**; 1289-1297.

¹⁷ Foo T, External fixation of femoral defects in athymic rats: Applications for human stem cell implantation and bone regeneration. *Journal of Tissue Engineering* 2013; 112-119.

¹⁸ Zhao Z, et al. Novel External Device for Bone Healing Research . *Tohoku J. Exp. Med*, 2009; 219 ;, 115-120

¹⁹ Drosse, I., Volkmer, E., Seitz, S., Seitz, H., Penzkofer, R., Zahn, K., et al. Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. *Tissue Eng. Part C Methods* 2008; **14**: 79-88.

²⁰ Miloro M, Haralson D, Desa V, Bone Healing in a Rabbit Mandibular Defect Using Platelet-Rich Plasma. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2010; 68, 1225–1230.

²¹ Russell, W, Burch, R. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, 1959.

²² Hollinger JO, Kleinschmidt MD. **The critical size defect s an experimental model to test bone repair materials**. *J Craniofac Surg*. 1990;1:60–68.