



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Modelos animales para evaluar el proceso de
reparación ósea mediado por el uso de Células
Madre Mesenquimales**

**Animal models to evaluate the bone repair process
mediated by Mesenchymal Stem Cells**

Autora: Ana Pando Feijoo

Directoras:

Prfa. Dra. Flor María Pérez Campo

Dra. Ana Alfonso Fernández

Santander, junio 2021

ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
RESUMEN/ABSTRACT	5
OBJETIVOS	6
METODOLOGÍA.....	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Composición y organización del tejido óseo	7
1.2 Organización	9
1.3 Maduración celular.....	10
1.3.1 Osteoblastos.....	10
1.3.2 Osteocitos.....	11
1.3.3 Osteoclastos	11
1.4 Homeostasis ósea: Interacción celular	12
1.4.1 Acoplamiento osteoclasto-osteoblasto	12
1.4.2 Osteocito – mecanorreceptor	13
1.5 Remodelado óseo.....	13
1.6 Células madre mesenquimales (MSCs): Papel en el tejido óseo	14
4.6.1 Fuentes de obtención.....	16
4.6.2 Otras fuentes.....	17
2. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LAS TÉCNICAS DE REGENERACIÓN ÓSEA	19
2.1 Fases de la regeneración ósea.....	19
2.2 Técnicas de administración de MSCs	20
2.3 Ingeniería tisular	21
5.3.1 Scaffolds:	22
5.3.2 Factores de crecimiento:.....	24
5.3.3 Estimulación mecánica:.....	25
2.4 Ventajas de la ingeniería tisular sobre terapias convencionales	25
3.PATOLOGÍAS DONDE LA REGENERACIÓN ÓSEA JUEGA UN PAPEL IMPORTANTE	26
3.1 Osteonecrosis	26
3.2 Pseudoartrosis.....	28
3.3 Osteoporosis.....	30
4. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN DESCRITOS PARA LA EVALUACIÓN DE MSC.....	31
4.1 Generalidades de modelos animales en el estudio de la reparación ósea	31
4.2. Modelos animales de osteonecrosis de la cabeza femoral	32

4.2.1 Modelos animales en la evaluación de MSC en osteonecrosis.....	33
4.3 Modelos animales de pseudoartrosis.....	38
4.3.1 Modelos animales en la evaluación de MSC en pseudoartrosis.....	40
4.4 Modelos animales de osteoporosis.....	45
4.4.1 Modelos animales en la evaluación de MSC en osteoporosis	46
5. ACTUALIZACIÓN SOBRE LOS USOS CLÍNICOS DE LA TERAPIA CELULAR EN REGENERACIÓN ÓSEA.....	51
6. CONCLUSIONES	52
AGRADECIMIENTOS.....	53
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	54
BIBLIOGRAFÍA.....	57

RESUMEN/ABSTRACT

Resumen

Las Células Madre Mesenquimales (MSCs) son células con alta capacidad para diferenciarse hacia diversos linajes celulares, incluido el linaje osteogénico. Sus propiedades anti-inflamatorias, inmunomoduladoras y su capacidad osteogénica, han suscitado un gran interés en su estudio como opción terapéutica en el campo de la Traumatología y la Ortopedia. En la práctica clínica podemos encontrar una serie de enfermedades ligadas a una regeneración ósea defectuosa, que requieren de un abordaje quirúrgico que, desafortunadamente, suele ir acompañado de diversas complicaciones. Por eso, actualmente hay un gran interés en el uso de las MSCs como una nueva alternativa terapéutica. Aunque la terapia celular e ingeniería tisular del aparato musculoesquelético se encuentran en pleno desarrollo, antes de poder trasladar los resultados al campo clínico, se necesita una investigación en profundidad de dichas terapias utilizando modelos animales donde se reproducen las patologías a tratar. En este trabajo se lleva a cabo una revisión bibliográfica sobre los estudios preclínicos más actuales en osteonecrosis de la cabeza femoral, pseudoartrosis y osteoporosis, con el fin de poder observar el avance en este tipo de terapias.

Palabras clave: MSCs, osteonecrosis, pseudoartrosis, osteoporosis, ingeniería tisular, preclínico, modelo animal.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are cells with a high capacity to differentiate into various cell lineages, being osteoblasts one of them. Due to their anti-inflammatory and immunomodulatory properties, as well as to its osteogenic capacity, MSCs have been the focus of many studies regarding their use as a therapeutic option in the field of Traumatology and Orthopaedics. In normal clinical practice we can find a series of diseases linked to a defective bone regeneration. Treatment of these pathologies frequently requires a surgical approach that, unfortunately, more often than not, leads to various complications. Therefore, there is currently a great interest in the use of MSCs as a new therapeutic alternative. Although the developing of treatments for musculoskeletal pathologies is currently a hot spot in the fields of cell therapy and tissue engineering, before any result can be transfer to the clinic, it is necessary to assay the effectiveness of those treatments in animal models that would simulate these pathologies. In order to have a general view on the progress of these type of therapies, in this work we have done a bibliographic review on some of the current preclinical studies in osteonecrosis of the femoral head, pseudoarthrosis and osteoporosis.

Keywords: *MSCs, osteonecrosis, pseudoarthrosis, osteoporosis, tissue engineering, "preclinical", animal model.*

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es estudiar la importancia de la terapia celular en el tratamiento de patologías óseas cuyo patrón común es la alteración en la regeneración ósea. Para ello ha sido fundamental explicar qué es y cómo se comporta el tejido óseo y el papel de las MSCs en este proceso. Además, se describen tres enfermedades óseas relativamente prevalentes y muy limitantes, que necesitan de una mejora de las opciones terapéuticas existentes. Así, se describe la etiopatogenia, diagnóstico y terapias actuales de cada una de dichas enfermedades y por qué las MSCs son una buena alternativa terapéutica en esos casos concretos.

Aunque también se ha realizado una revisión bibliográfica más amplia sobre los aspectos más importantes de la terapia celular, este trabajo ha revisado principalmente los modelos animales descritos para cada enfermedad, así como de la evaluación del uso de MSCs sobre estos modelos. El objetivo principal consiste en abarcar las investigaciones más relevantes y actualizadas disponibles sobre cómo se aplican este tipo de células en las diferentes terapias y los resultados de estas.

METODOLOGÍA

Para empezar con la revisión y adquirir los conocimientos básicos sobre el tema, se han consultado libros especializados como: *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*, *Traumatología y Ortopedia. Generalidades*, *EMC-Aparato Locomotor* y *Kelley y Firestein: Tratado de Reumatología*.

Para la consulta de artículos científicos se ha utilizado la base de datos *PubMed*, ya que reúne la mayoría de los artículos sobre la terapia celular en regeneración ósea y su estudio en animales. En términos generales, se han escogido las publicaciones más actualizadas, de los últimos 5 años. Además, se han analizado numerosas revisiones bibliográficas. Las palabras clave utilizadas para la búsqueda de artículos han sido: MSCs, osteonecrosis, pseudoartrosis, osteoporosis, modelos animales, ingeniería tisular y regeneración ósea.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 COMPOSICIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es un tejido conjuntivo mineralizado, resistente y parcialmente elástico. Su función más importante es la mecánica, proporcionando protección a los órganos vitales y ayudando en el movimiento corporal. Además, el tejido óseo participa en procesos como la homeostasis fosfo-cálcica (siendo el mayor reservorio de ambos elementos en nuestro cuerpo) y en el metabolismo de la glucosa y deposición de grasa(1).

El hueso está compuesto por células y por una matriz extracelular, dentro de la cuál podemos distinguir una parte mineral y una parte orgánica. Esta matriz es un tejido altamente dinámico. Aproximadamente el 65% de su masa es mineral (principalmente hidroxapatita), un 25% de la masa ósea es de naturaleza orgánica y el 10% restante corresponde a agua(2). Las características de cada una de estas partes se detallan a continuación:

- **Matriz extracelular**

- **Componente Mineral:** Compuesto por calcio y fósforo en forma de cristales de hidroxapatita con morfología con forma de aguja, que se intercalan entre las fibras de colágeno. Esta matriz proporciona la rigidez característica del hueso.
- **Componente Orgánico:** Formada por colágeno, proteínas y otros componentes
 - **Colágeno:** El colágeno tipo I es el más abundante en la matriz extracelular, representando un 90% del total. El colágeno proporciona cierta elasticidad al tejido. La orientación de las fibras de colágeno depende de los requerimientos mecánicos del hueso. Estas fibras se disponen longitudinalmente donde el hueso está sometido a tensión y transversalmente en aquellas zonas sometidas a compresión.
 - **Proteínas no colágenas:** Representan el 2% de todo el tejido óseo. Tienen un papel importante en la organización de la matriz ósea, en los procesos de mineralización y remodelación ósea, en las interacciones celulares, la quimiotaxis e incluso interacciones con otros órganos. Podemos dividirlos en factores de crecimiento, proteínas plasmáticas, proteoglicanos y glicoproteínas.
 - **Otros componentes:**
 - **Lípidos:** rodean las células óseas y regulan el flujo de iones.
 - **Agua:** Se une al colágeno y a los cristales de hidroxapatita. Se sitúa en los poros corticales.

- **Células:** Dentro del tejido óseo podemos diferenciar varios tipos de células.
 - **Osteoblastos:** Células responsables de la formación de la matriz ósea y de su mineralización. Sintetizan las proteínas que componen la matriz(1). Después de haber realizado su función algunos osteoblastos quedan inmersos en la matriz ósea durante su maduración, transformándose en osteocitos. Otros se aplanan quedándose en la superficie ósea y pasándose a llamar células de revestimiento. Aquellos que no cumplan ninguno de estos dos destinos, alrededor de un 60-80%, entran en apoptosis(3).
 - **Osteocitos:** Como ya se ha comentado, se forman a partir de osteoblastos que quedan inmersos en la matriz ósea durante el proceso de maduración. Estas células funcionan como mecanosensores muy sensibles, transformando los estímulos mecánicos en señales biológicas que inducen la formación o resorción ósea(4). El osteocito maduro se encuentra situado dentro de la matriz mineralizada y está en comunicación directa con otros osteocitos y con los osteoblastos superficiales. Los osteocitos se encuentran acoplados metabólicamente y eléctricamente mediante complejos proteicos de unión gap(5).
 - **Célula de revestimiento:** Son osteoblastos que han adquirido una estructura aplanada y se encuentran en la superficie del tejido óseo, formando una barrera funcional entre la médula ósea (MO) y el tejido óseo en la fase quiescente de la remodelación ósea. Para que se lleve a cabo el remodelado óseo es necesario que estas células se retraigan y digieran el colágeno que dejan los osteoclastos en las lagunas de Howship. Expresan marcadores en la superficie característicos también de las MSCs. Participan en la atracción de las células hematopoyéticas precursoras de osteoclastos(6). Se consideran células quiescentes. Descansan sobre una capa fina de osteoide que se pierde al inicio del remodelado para que la matriz quede expuesta a los osteoclastos(7).
 - **Osteoclastos:** Son células multinucleadas de gran tamaño que se originan a partir de las células madre hematopoyéticas. Se encuentran en las lagunas de Howship. Su función es la reabsorción de la matriz ósea. Se caracterizan por un borde festoneado, constituido por una membrana plasmática muy plegada, en contacto con la matriz ósea, diseñado para reabsorber proteínas e iones en el espacio entre el hueso y el osteoclasto.
 - **Células Madre Mesenquimales de la Médula ósea:** Estas células multipotentes residen en la médula ósea y están implicadas en la homeostasis del tejido óseo. En este trabajo se les dedica un apartado especial donde describiremos sus principales características

1.2 ORGANIZACIÓN

El tejido óseo puede clasificarse, desde el punto de vista ultraestructural, en hueso fibroso y laminar. El hueso fibroso está formado por fibras colágenas desorganizadas y está mineralizado de forma irregular. Este tipo de hueso se forma sin matriz previa. Se encuentra en el hueso fetal, en los callos de fractura, tumoraciones u osificaciones ectópicas. Por otro lado, el hueso laminar es aquel en el que las fibras de colágeno y el componente mineral se disponen en capas que forman bandas circunferenciales.

Macroscópicamente podemos diferenciar dos tipos de hueso, el hueso compacto o cortical y el hueso trabecular o esponjoso (**Figura 1**). El primero representa el 80% del esqueleto, y está en la parte externa de los huesos y en la diáfisis de huesos largos. Este hueso está formado por unidades cilíndricas llamadas osteonas. Éstas presentan un canal central llamado canal de Volkman y canales conectando entre osteonas llamado conductos de Harvers. El hueso cortical tiene poca actividad metabólica, pero resiste muy bien a la torsión y tensión.

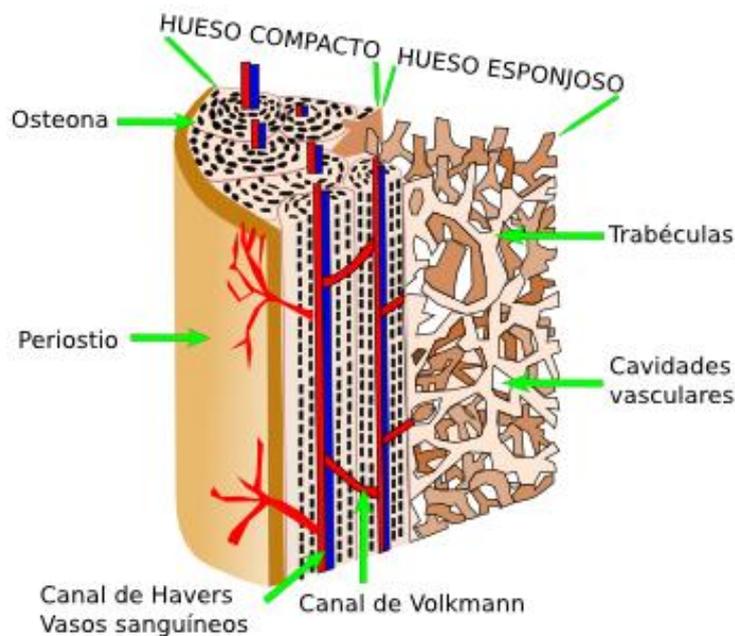


Figura 1: Esquema de la estructura del hueso. Se distinguen los dos tipos de tejido óseo. Imagen obtenida de https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_oseo.php

El hueso esponjoso está formado por hemiosteonas orientadas hacia la medula ósea. Este tipo de hueso puede encontrarse en metáfisis, vertebras, costillas y pelvis. La estructura del hueso esponjoso está formada por pilares y placas conectados entre sí, formando una red trabecular, con espacios llenos de medula ósea y numerosos vasos sanguíneos. Este tipo de hueso se orienta según las presiones mecánicas a las que se somete. Tiene una remodelación ósea más rápida en comparación con el hueso cortical, tiene mayor actividad metabólica, es más elástico y resiste mejor a la compresión y el cizallamiento(1).

1.3 MADURACIÓN CELULAR

1.3.1 Osteoblastos

Proceden de las células madre mesenquimales de la médula ósea (BM-MSc). La diferenciación osteoblástica de las MSCs depende de la expresión de dos factores *Runx2* (Runx family transcription factor 2) y *Osx* (Osterix), que son factores de transcripción que se activan frente a estímulos externos como las proteínas Wntless (Wnt) y proteínas morfogénicas del hueso (BMPs de sus siglas en inglés)(2). *Runx2* es el primer factor en actuar y dirige la expresión de numerosos genes osteoblásticos, incluyendo Osteocalcina (*BGLAP*), Osteopontina (*OPN*), Sialoproteína ósea (*IBSP*) o el Colágeno tipo 1 α (*COL1A1*). *Runx2* se fija en el promotor del gen de *OSX* regulándolo positivamente(1) y *Osx* coopera con *Runx2* regulando la transcripción de los genes anteriormente señalados(8).

Las BMPs son un conjunto de proteínas endógenas pertenecientes a la familia de TGF- β . Estimulan la expresión tanto de *RUNX2* como de *OSX* (Figura 2). Ejercen su acción uniéndose a un receptor tetramérico y, con ello, activan, o bien una vía clásica de señalización intracelular dependiente de las proteínas *Smad*, o bien una vía que implica a las cinasas MAP (proteína-cinasa activada por mitógenos) p38(1). BMP2 aumenta el conjunto de progenitores y tiene un papel importante en el proceso de osificación endocondral(9). Por su parte, BMP7 aumenta la actividad fosfatasa alcalina, favoreciendo la mineralización(10).

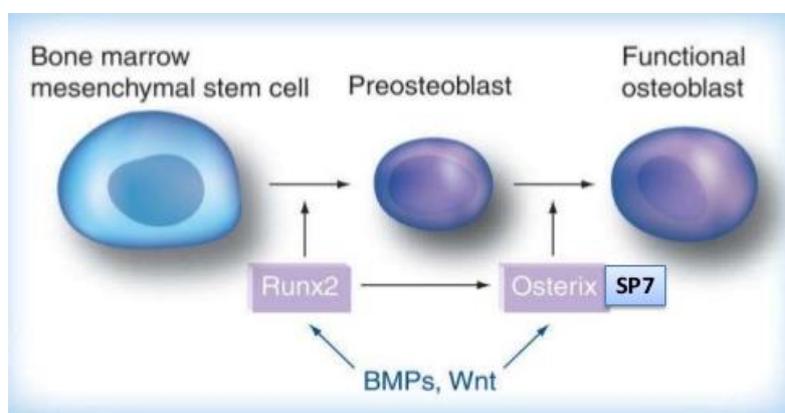


Figura 2: Esquema de la acción de BMPs y proteínas Wnt sobre la diferenciación osteoblástica. Imagen obtenida de Zhang H, Recker R, Paul Lee W. *Proteomics in bone research. Expert Rev Proteomics. 2010;7(1); 103-111.*

La vía Wnt/LRP5/ β -catenina estimula también la diferenciación osteoblástica. Las proteínas Wnt se unen al receptor Frizzled junto al correceptor de lipoproteínas de baja densidad 5 (*Lrp5*). Esto estabiliza la actividad de la glucógeno-sintasa-cinasa-3- β impidiendo la fosforilación de la β -catenina. La β -catenina se mantiene por lo tanto estable y puede penetrar en el núcleo de los osteoblastos y regular los genes diana de esta vía, estimulando la diferenciación osteoblástica. Esta es la vía de señalización intracelular principal, sin embargo, existen vías secundarias(1). Se diferencian 19 glucoproteínas Wnt. Por ejemplo la *wnt10b*, favorece la activación de las MSCs hacia la osteoblastogénesis y también bloquea los factores de transcripción hacia la vía adipogénica(11).

1.3.2 Osteocitos

Proceden de los osteoblastos que se internalizan en el osteoide y comienzan a extender proyecciones dendríticas transformándose en osteocitos. El cambio que sufren implica una transformación de una célula grande poligonal a una célula pequeña con multitud de prolongaciones citoplasmáticas. Su diferenciación se inicia por una elevada expresión de podoplanina (E11)(12).

1.3.3 Osteoclastos

Se forman a partir de la fusión de precursores mononucleares del linaje monocito/macrófago. El factor nuclear de las células T activadas 1 (NFATc1) es el factor de transcripción principal responsable de la diferenciación y función de los osteoclastos. Las MSCs y los osteoblastos secretan dos citocinas imprescindibles en la osteoclastogénesis: el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANK-L) y el factor estimulante de las colonias de tipo monocito/macrófago (M-CSF)(4).

El M-CSF secretado por los osteoblastos se une a su receptor c-Fms para estimular la expresión del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANK) en los precursores osteoclásticos. La interacción de RANK-L, secretado por los osteoblastos y las células estromales, con estos receptores RANK produce la fusión de los progenitores osteoclásticos en células gigantes multinucleares. La unión del ligando activa diferentes vías de señalización intracelulares en el precursor osteoclástico que promueven la diferenciación y activación (**Figura3**). RANKL además de estimular la osteoclastogénesis, potencia la actividad de los osteoclastos maduros(13).

La osteoprotegerina (OPG) es un receptor circulante que se fija al RANK-L e impide la diferenciación osteoclástica. Es una citocina que veremos en el siguiente apartado sobre la homeostasis ósea.

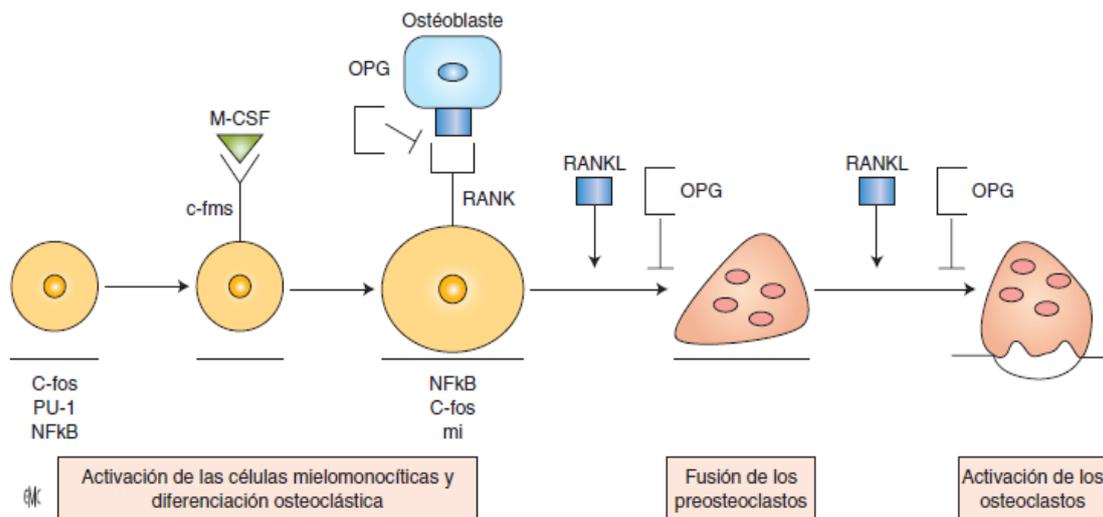


Figura 3: Esquema de la diferenciación osteoclastogénica. En un inicio interviene M-CSF y RANK-L, y en las fases de fusión y activación, toma mayor importancia RANK-L. Imagen obtenida de: Levasseur R. Fisiología del tejido óseo. EMC - Apar Locomot. 2019;52(2):1-25.

1.4 HOMEOSTASIS ÓSEA: INTERACCIÓN CELULAR

1.4.1 Acoplamiento osteoclasto-osteoblasto

La coordinación adecuada entre formación y destrucción ósea es esencial para mantener la integridad del hueso. Este acoplamiento permite la adaptación del tejido a los requerimientos físicos y el mantenimiento de la resistencia. El proceso de acoplamiento implica varios mecanismos:

- 1) Los osteoblastos, son el primer nivel de enlace entre formación y resorción mediante la expresión de citocinas como RANK-L., que como ya hemos visto, controla el proceso de diferenciación osteoclástica. En respuesta a la señalización Wnt, los precursores de los osteoblastos se convierten en osteoblastos maduros, disminuyendo la expresión de citocinas que apoyan a la expresión de osteoclastos. Es entonces cuando secretan moléculas antiosteoclastogénicas como OPG que bloquean la diferenciación de los osteoclastos. OPG actúa como un receptor trampa y, de esta manera, inhibe la vía RANK/RANKL. Lo producen los osteoblastos, las células madre mesenquimatosas, las células estromales y otras células. La relación entre la cantidad de RANKL, que favorece la osteoclastogénesis, y de OPG, que la inhibe, es lo que determina el grado de reabsorción osteoclástica(1) (**Figura 4**).
- 2) Señalización bidireccional de ligando efrina/receptor de efrina. Este segundo paso, consiste en que los precursores osteoclásticos expresan ligandos de efrina sobre su superficie. Éstos se unen a sus receptores. Y activan la función tirosina cinasa que estimula la diferenciación osteoblástica y la formación ósea(3).

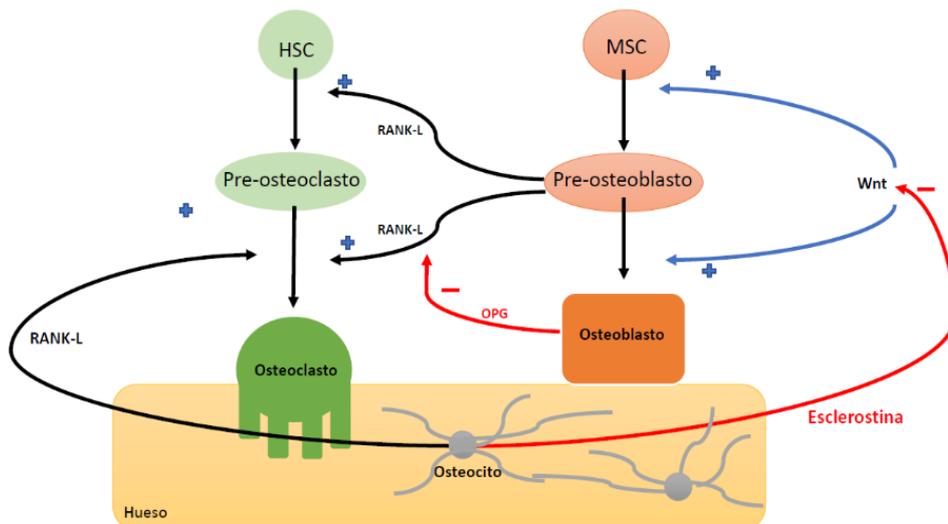


Figura 4: Esquema sobre la regulación del osteocito sobre el osteoclasto y osteoblasto.

1.4.2 Osteocito – mecanorreceptor

Como puede observarse en la **Figura 4** los osteocitos están intensamente conectados entre sí, con otras células de la superficie y con los osteoblastos, que regulan su actividad. En respuesta a diferentes factores, los osteocitos modifican la velocidad del remodelado y el balance entre formación y resorción. Niveles de carga fisiológicos reducen el número de osteocitos apoptóticos, mientras que la disminución de la carga mecánica induce la apoptosis de los osteocitos y aumenta la resorción ósea. Cuando el osteocito detecta falta de carga mecánica, secreta esclerostina que se une a las proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas LRP5 antagonizando la señalización de la vía Wnt e inhibiendo la formación ósea. También libera RANK-L. Cuando se aplican fuerzas mecánicas al hueso, los osteocitos dejan de secretar esclerostina(3).

Existen otros estímulos que pueden modificar la actividad de los osteocitos como las microlesiones por el desgaste óseo, da lugar a la apoptosis de los osteocitos, que liberan RANK-L cerca de la lesión, relacionándose con un incremento de la resorción ósea(15).

Los osteocitos intervienen en la homeostasis fosfocálcica. Permite la movilización rápida del calcio de la matriz ósea hacia la circulación general mediante la secreción de RANK-L(4).

1.5 REMODELADO ÓSEO

Se conoce como remodelado óseo el proceso de constante renovación del tejido óseo. Durante el periodo de crecimiento, el hueso sufre este proceso de forma constante. En la vida adulta estos procesos de remodelado siguen activos como consecuencia de los diferentes cambios de carga mecánica, microfracturas o el mantenimiento de una homeostasis celular y mineral en el organismo. Hay un proceso de reabsorción de partes del hueso viejo o deteriorado y sustitución por una nueva matriz proteica que después se mineralizará. Este proceso se mantiene a lo largo de la vida, aunque disminuye su velocidad con el paso de los años.

Durante el proceso de remodelado óseo se forman estructuras temporales que se denominan unidades multicéntricas básicas, formadas por osteoblastos y osteoclastos que de manera coordinada llevan a cabo el proceso en diferentes fases. La activación del remodelado óseo se inicia en el lugar donde las células de revestimiento se retraen. En este punto se degrada la matriz colagénica subyacente, y se produce el reclutamiento de los precursores de los osteoclastos, que provienen de la sangre. Los precursores de osteoclastos se fusionan y dan lugar a los pre-osteoclastos. Éstos se unen a la matriz y se convierten en osteoclastos encargados de la resorción. Los osteoclastos acidifican la superficie del hueso y forman las lagunas de Howship. Después las MSCs migran desde el hueso adyacente hacia la superficie expuesta, donde se diferencian hacia

osteoblastos. Los osteoblastos formarán una nueva matriz proteica, que más adelante se mineralizará. El ciclo termina con la fase de quiescencia donde se disponen las células de revestimiento (**Figura 5**)(1,3,16).

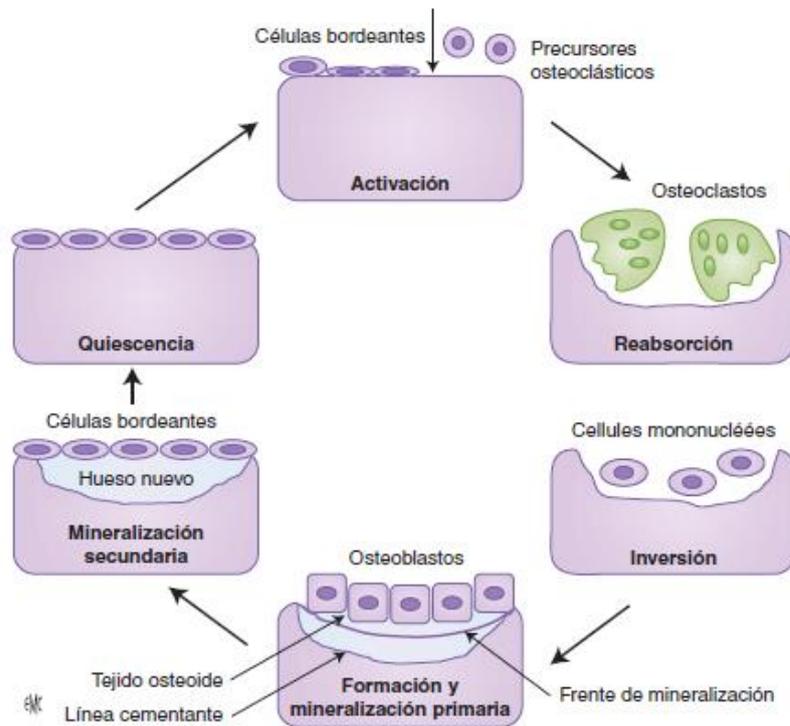


Figura 5: Esquema del proceso de remodelado óseo. Imagen tomada de Levasseur R. *Fisiología del tejido óseo*. EMC - Apar Locomot. 2019;52(2):1–25

1.6 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs): PAPEL EN EL TEJIDO ÓSEO

Las células madre son células indiferenciadas con capacidad de autorrenovación y de diferenciación hacia diferentes tipos celulares. Estas células pueden clasificarse en función de su capacidad para producir diferentes linajes celulares, algo conocido como “potencialidad”. Las células **totipotentes** son capaces de formar todos los tipos y linajes celulares, incluidos los tejidos extraembrionarios (útero y cordón umbilical). Un ejemplo de este tipo de células son aquellas que constituyen el embrión temprano, en las etapas previas a la formación del blastocisto. Las células **pluripotentes** tienen la capacidad de formar todos los linajes del cuerpo, como son las células madre embrionarias (CMEs). Las células **multipotentes** pueden formar múltiples tipos celulares, normalmente de una capa embrionaria concreta, y las **unipotentes** forman un único tipo celular. Ésta es la clasificación clásica. Hoy en día existe una nueva categoría, las células madre pluripotentes inducidas (CMPis), obtenidas a partir de la tecnología reprogramadora.

Las células madre más utilizadas en la ingeniería tisular son las células madre de tejidos adultos. Estas células son multipotentes, por lo que su potencial de diferenciación no es tan amplio como el de las CMEs o CMPis. Sin embargo, son más seguras desde el punto de vista de su utilización en la clínica debido a que su capacidad

proliferativa es más limitada y por lo tanto hay un menor riesgo de formación tumoral, porque no es necesario destruir embriones para obtenerlas y por ende su uso no provoca conflictos éticos. Se pueden aislar a partir prácticamente todos los tejidos del organismo adulto, donde se encuentran para reemplazar las células que se pierden por envejecimiento o lesión tisular. Las células madre de tejidos adultos son un tipo de células muy importante en la ingeniería tisular(17).

Las MSCs, que ya hemos mencionado, se encuentran dentro del grupo de células madre del tejido adultos.

En los años 70, Friedenstein y cols(18). aislaron por primera vez células formadoras de colonias de fibroblastos de la médula ósea de un ratón. Las llamaron así porque eran capaces de adherirse al medio de cultivo y formaban colonias. Más tarde, en los años 80, Caplan descubre la gran capacidad de estas células para diferenciarse, sobretodo hacia células de linaje mesodérmico. Durante los 2000 se comienzan a desarrollar biomateriales como soporte y así facilitar la regeneración de tejidos, iniciando el desarrollo de una gran cantidad de investigaciones en medicina regenerativa e ingeniería tisular(19).

1. Plástico-adherentes en cultivo estándar		
2. Expresión antígenos de superficie	(+) >95%	(-) <2%
	- CD37	- CD34
	- CD90	- CD45
	- CD105	- CD14
		- HLA-DR
		- CD11b
		- CD19
3. Capacidad para diferenciarse <i>in vitro</i> en osteoblastos, condroblastos y adipocitos.		

Tabla 1: Criterios de MSCs desarrollada por la Sociedad Internacional de Terapia Celular en 2006.

Con el objetivo de homogenizar la descripción de las MSCs, en el 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular estableció que las MSCs deberían cumplir los criterios que se muestran en la **Tabla 1**. Estos criterios se han quedado anticuados a día de hoy y precisan de una modificación, especialmente en lo que se refiere a los antígenos de superficie, tanto *in vivo* como *in vitro*(20,21). El problema del panel convencional de marcadores de superficie es la heterogeneidad ya demostrada de las MSCs. Además, las MSC existen en varios tejidos, pero las diferencias entre MSC derivadas de diferentes tejidos aun no se conocen con certeza. Debido a la heterogeneidad de esta población, se deben adoptar nuevas tecnologías, como la secuenciación de ARN a nivel unicelular, la proteómica y la epigenómica, para investigar la complejidad de las estas células(22). En los últimos años además existe cierta cotroversia sobre si estas células pueden ser consideradas o no células madre. Bhartiya(23) unifica el descontento de varios investigadores y recalca que no se deben considerar células madre a las MSCs. Según la definición de *National Institute of health* (NIH), las verdaderas células madre se someten a divisiones celulares asimétricas, es decir, se dividen para autorrenovarse y para dar lugar a unas células un poco más diferenciadas, sin embargo, las MSCs, no se someten a este tipo de divisiones; más bien, se someten a divisiones celulares simétricas rápidas. Asimismo, Caplan insta a que se cambie el nombre de las MSC a “Células de señalización

medicinal” para reflejar con mayor precisión el hecho de que la acción terapéutica de estas células no se basa en su capacidad de autoregeneración, sino en que se sitúan en sitios de lesión o enfermedad y secretan factores bioactivos, que en su conjunto tienen una actividad regeneradora. Esto significa que estas células son “fármacos terapéuticos” *in situ*. De hecho, son las células madre residentes específicas del tejido del propio paciente las que construyen el nuevo tejido, estimuladas por los factores secretados por las MSCs suministradas exógenamente(24). Esto ha supuesto un cambio de paradigma, ya que en un principio se creía que la capacidad de diferenciación era el mecanismo principal para promover la regeneración tisular(25).

A continuación se comentan las propiedades más importantes de las MSCs:

Estas células poseen función trófica regulando la homeostasis del nicho hematopoyético de la MO, capacidad migratoria hacia lugares dañados o también denominado *homing* y función proliferativa, para la autorenovación y la expansión celular(19).

Las MSCs tienen una importante función inmunomoduladora ya que son capaces de reducir las respuestas inmunitarias excesivas de las células T, B, Natural Killer (NK), dendríticas y macrófagos(20). Las MSCs llevan a cabo esta función mediante la secreción de citocinas específicas, tales como el factor de crecimiento de hepatocitos, TGFβ, interleucina 6 (IL6) e interleucina 10 (IL10), enzimas como óxido nítrico sintasa (iNOS) u hormonas pleiotrópicas como la prostaglandina E2 (PGE), que modulan la inflamación de la lesión. Las MSCs obstaculizan la proliferación y activación de los linfocitos T. Son hipoinmunogénicas, y esto se debe a que expresan pocas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y así no pueden ser eliminadas por las NKs. No expresan tampoco el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) impidiendo ser reconocidas por las células T CD4⁺ alorreactivas.

La función inmunosupresora de las MSCs es importante en todos los procesos regenerativos, ya que tras una lesión tisular, se creará un microambiente hostil, inflamatorio, con muchas células sufriendo apoptosis. Es ahí donde esta función posee un gran papel secretando sustancias antiinflamatorias y antiapoptóticas que permiten la creación de un medio apropiado para la proliferación y diferenciación de las células endógenas movilizadas hasta el sitio de daño.

En función del estímulo recibido, las MSCs pueden diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos o condrocitos. La diferenciación se percibe morfológicamente y/o con la expresión específica de biomarcadores. Para promover la diferenciación *in vitro* se utilizan moléculas como citocinas, sustancias químicas, hormonas, vitaminas y/o apoyos físicos o mecánicos como los *scaffolds* o biosoportos. La diferenciación osteogénica implica muchas vías de señalización, que, como ya comentamos, dependen en última instancia de la acción del factor de transcripción *Runx2* asociado a *Osx*(26).

4.6.1 Fuentes de obtención

Las MSCs se pueden extraer de múltiples tejidos adultos, incluyendo médula ósea (MO), placenta, cordón umbilical, tejido vascular, adiposo, cartilaginoso, cerebral, dental o endometrial, etc(27). Las MSCs de MO han dado buenos resultados en estudios

preclínicos, sin embargo, la obtención de estas células tiene ciertas limitaciones(27). Las MSCs representan entre un 0,001 – 0,01 % de todas las células de la MO y por lo tanto el número de MSCs que se pueden aislar a partir de esta localización es muy reducido. Por ello, se requiere de su expansión *in vitro*, para obtener un número de células adecuadas que nos permitan llevar a cabo los procedimientos terapéuticos posteriores. En este proceso de expansión *in vitro*, las MSCs pueden sufrir alteraciones en su potencialidad y capacidad proliferativa(28), lo cual puede derivar en una baja eficiencia regenerativa. La edad del donante es otro inconveniente a tener en cuenta. Las personas mayores tienen menor cantidad de MSCs en la MO y la diferenciación de estas células tiende hacia la estirpe adipogénica a expensas de la osteogénica(29). Estas limitaciones han fomentado la búsqueda de nuevas fuentes. Entre ellas, la más prometedora a nivel clínico es el tejido adiposo (AD-MS). Entre sus ventajas podemos enumerar: un potencial osteogénico similar a las procedentes de médula ósea, son más accesibles (mediante liposucción), y abundantes. Por esta última característica, no requieren una expansión *in vitro* tan extensa como las derivadas de la médula ósea. (1 gr. de tejido posee 5×10^3 , donde las MSCs representan entre el 1 y 5% de las células aisladas)(27). A pesar de las altas expectativas de este tipo de células, faltan estudios para garantizar que su utilidad sea comparable a la de las obtenidas de la MO.

Dentro de las aplicaciones a las que se dirige la terapia celular (Figura 6), la cirugía ortopédica representa aproximadamente un 15,8%(20). Aun así, falta un extenso camino de investigación para poder saber qué fuente es la más adecuada en la regeneración ósea, al igual que la estandarización de los procesos, algo que es necesario desarrollar para que la ingeniería tisular se transforme en una realidad.

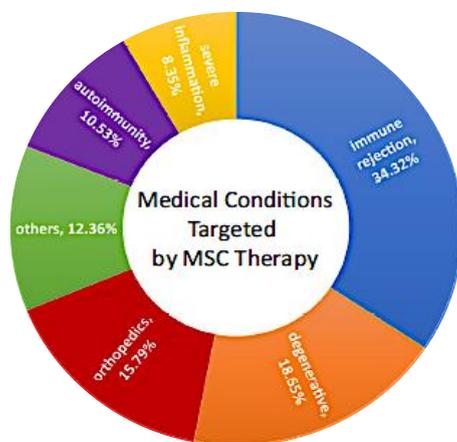


Figura 6: Diagrama de las condiciones a las que se dirigen las MSCs por proporción de ensayos clínicos. Los datos fueron obtenidos de clinicaltrials.gov. La búsqueda se completó en abril de 2019. Imagen obtenida de: Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. *Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications*. Vol. 76, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2019. p. 3323–48.

Como expresa la **Tabla 2**, las fuentes más investigadas en este área poseen diferentes ventajas y desventajas a tener en cuenta para su aplicación en ortopedia.

4.6.2 Otras fuentes

Una de las fuentes que más expectativas ha generado últimamente es el hueso cortical. Trabajos previos experimentales muestran que, en comparación con BM-MS y AD-MS, las MSCs del hueso cortical (CB-MS) tienen una capacidad superior de sobrevivir en condiciones hipóxicas. Las CB-MS comparten con las BM-MS

propiedades funcionales como el capacidad de triple diferenciación en condiciones adecuadas e inmunosupresión tanto *in vitro* como *in vivo*. En comparación con las BM-MSCs, son de mayor tamaño, y tienen un mayor compromiso con el linaje osteogénico. Se ha demostrado *in vitro* que la fuente celular genera una mayor cantidad de fosfatasa alcalina y depósito de calcio en condiciones tanto normóxicas como hipóxicas constituyendo una promesa en el ámbito de la la terapia celular e ingeniería de tejidos óseos. Sin embargo, hasta la fecha, muy pocos estudios han examinado el uso de CB-MSC y *scaffolds* para la regeneración ósea. Quizás en un futuro cercano, las CB-MSC también se considerarán candidatas prometedoras en la ingeniería tisular para la regeneración ósea(30).

Fuente de MSC		VENTAJAS	DESVENTAJAS
Tejido Adulto	Médula Ósea(27)	<ul style="list-style-type: none"> - Alto potencial osteogénico - Las más estudiadas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Cantidad limitada. - Requieren expansión <i>in vitro</i>. - Morbilidad en zona donante -> Dolor y posibles infecciones. - La edad del donante es un factor negativo(29,31).
	Tejido adiposo(32)	<ul style="list-style-type: none"> - Características osteogénicas similares - Muy abundantes. (1000 MSC más en 1 gr de tejido adiposo que en 1 gr de M.O)(33) - Fácil obtención, menor morbilidad - Se pueden mantener más tiempo en cultivo sin que se alteren sus propiedades(32) - Mayor capacidad proliferativa que las de M.O(34) 	<ul style="list-style-type: none"> - Se necesitan más estudios para probar su uso en reparación ósea - A nivel clonal solo el 21% de las células adherentes eran tripotentes y solo el 48% de los clones eran osteogénicos(28)
	Fracción vascular estromal derivada de tejido adiposo	<ul style="list-style-type: none"> - Fuente abundante. - Capaz de formar hueso vascularizado. 	<ul style="list-style-type: none"> - Poblaciones celulares varían entre donantes. - Requieren de un proceso de aislamiento de muchos pasos de 2 o 3 horas.
	Embrionarias(33)	<ul style="list-style-type: none"> - Pluripotentes 	<ul style="list-style-type: none"> - Trasplantadas <i>in vivo</i> se desarrollan teratomas. - Restricciones éticas y regulatorias
	Cordón umbilical(28)	<ul style="list-style-type: none"> - Retardo de senescencia. - Mayores efectos antiinflamatorios. - Obtención indolora. - Autorrenovación más rápida que de BMMSC. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aislamiento más difícil que de MO. - Tiene que haber compatibilidad inmunogénica. - Se necesitan más estudios para comprobar el uso en la reparación ósea.

Tabla 2: Ventajas e inconvenientes de los diferentes tipos de MSCs según su tejido de procedencia.

2. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LAS TÉCNICAS DE REGENERACIÓN ÓSEA

2.1 FASES DE LA REGENERACIÓN ÓSEA

A continuación, se describen brevemente las diferentes fases de las que consta el proceso de regeneración ósea.

- **Inflamación:** La fractura ósea provoca un daño vascular dando lugar a un hematoma en la zona. Como consecuencia se activa el mecanismo de coagulación formándose un coágulo de fibrina. Se adhieren plaquetas que liberan mediadores vasoactivos, citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento que estimulan tanto la osteogénesis como la angiogénesis (**Figura 7**). A su vez, al sitio de daño llegan células inflamatorias, leucocitos polimorfonucleares, seguidos de macrófagos, que eliminan el tejido necrótico(35–38).
- **Proliferación y diferenciación celular:** Después de la primera semana, el coágulo es invadido por capilares y fibroblastos, que lo transforman en tejido conjuntivo de granulación formado por fibroblastos, macrófagos, colágeno y vasos sanguíneos de nueva formación. Este tejido es invadido por MSCs que migran de tejidos próximos, diferenciándose hacia la estirpe osteogénica o condrogénica. Se empieza a formar hueso desorganizado, poco estable dirigido por los factores como BMP, TFG- β , FGF, VEGF y PDFG ya que los osteoblastos sintetizan una nueva matriz ósea orgánica que se irá calcificando, dando lugar a hueso fibroso. Esta combinación de matriz, osteoblastos y hueso fibroso se denomina callo de fractura(35–38).
- **Remodelación:** Es la etapa más larga del proceso. Durante esta fase, el callo de fractura sufre, consecutivamente, reabsorción y deposición hasta adquirir una estructura más organizada, similar histológicamente al hueso lamelar. Paralelamente al proceso biológico descrito, el hueso experimenta una evolución en sus propiedades mecánicas hasta que se recuperan sus valores de resistencia. Las trabéculas óseas se orientan en sentido funcional según las líneas de fuerza y tracción. Se considera que la remodelación completa del callo de fractura de un hueso largo puede durar hasta un año(35–38).

Existen dos tipos básicos de consolidación según la estabilidad de la fijación: La **consolidación intramembranosa** es promovida por las fracturas estables y tiene lugar cuando existe un contacto absoluto entre los fragmentos óseos. Se obtiene mediante la reducción abierta y fijación interna estable. No se observa en la naturaleza. Las MSCs se transforman directamente en hueso. Por otro lado, la **consolidación secundaria o endocondral:** ocurre en la inmovilización y depende de la formación del callo fibrocartilaginoso que madura a cartílago mineralizado, dando lugar a un hueso reticular y finalmente laminar. Es la consolidación más frecuente, ya que es el proceso de consolidación espontáneo que se da en la naturaleza, con el tratamiento conservador y con la reducción abierta sin estabilidad absoluta del foco de fractura. Las MSCs se diferencian primero en condrocitos, los cuales son posteriormente sustituidos por células óseas(16,39).

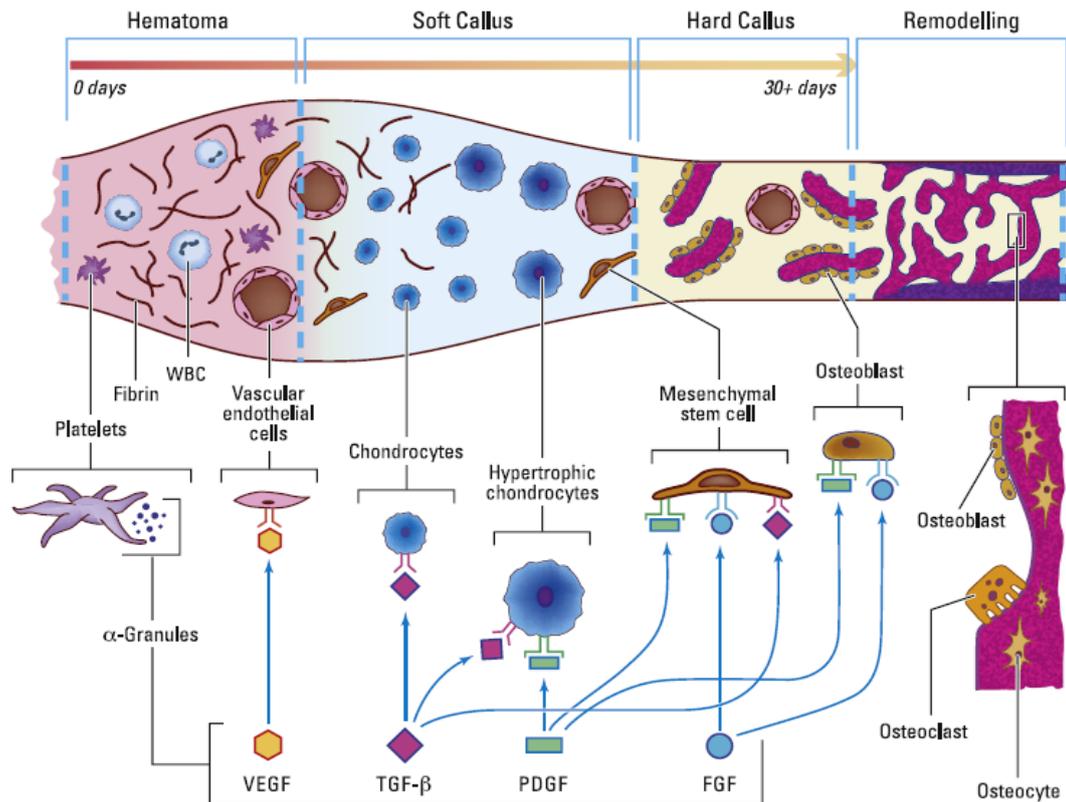


Figura 7: Esquema de las diferentes fases de la remodelación del callo de fractura y los factores que participan en ella. Imagen obtenida de Malhortra A, Pelletier MH, Yu Y, Walsh WR. Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. Arch Orthop Trauma Surg 2013;133(2): 153 – 165

2.2 TÉCNICAS DE ADMINISTRACIÓN DE MSCs

Las MSCs se pueden administrar de distintas maneras en las terapias destinadas a la regeneración ósea(17) (**Figura8**):

- **Inyección sistémica:** La vía intravenosa es la más común y mínimamente invasiva, con un potencial de distribución muy amplio. A pesar de la facilidad de administración, su mayor desventaja es el atrapamiento que sufren las células en el pulmón(29). Alternativamente, la vía intraarterial supera los inconvenientes de la intravenosa, sin embargo, es más invasiva que la intravenosa. En ambos casos se ha reportado la formación de microémbolos(33,40). Al igual que en los estudios de fármacos hay una dosis celular eficaz (ECD) que se define como el mínimo de células necesario para discernir el efecto terapéutico. Sin embargo, aún no se ha llegado a un consenso respecto a esta cifra.
- **Inyección local:** Las MSCs suelen ser extraídas mediante aspiración de médula ósea de la cresta iliaca, esternón o tibia y se inyecta en el sitio del hueso afecto. La aspiración de médula ósea que contiene MSCs, se denomina concentrado de medula ósea (BMAC o Bone Marrow Aspirate Concentrate). Se reduce el volumen del aspirado y así aumenta la concentración de MSCs. Se eliminan glóbulos rojos y plasma antes de la inyección. La concentración óptima está en debate. Algunos investigadores creen que el ECD para

MSCs debe ser superior al millón de células por cm^3 de tejido para ser eficaz, sin embargo, a pesar del ECD otros investigadores opinan que se debe combinar con una inyección sistémica. Una de las limitaciones de este método es el pequeño número de MSCs en la MO, como ya hemos comentado(33). Para ayudar en la regeneración ósea la inyección local suele ser intramedular o en el foco de fractura, dependiendo de la patología a tratar.

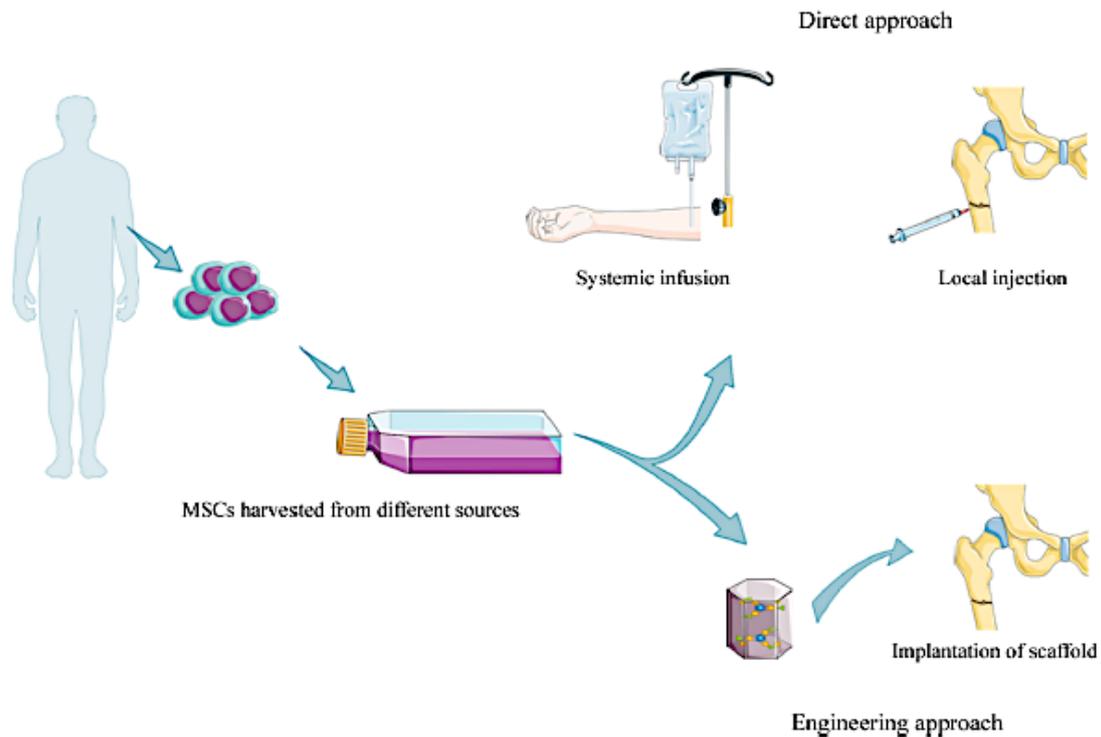


Figura 8: Esquema sobre las diferentes formas de administración de las MSCs. Se pueden inyectar IV, de forma directa al hueso que queremos tratar, o cultivarlas junto a un scaffold y trasplantarlo al hueso. laquinta MR, Mazzoni E, Bononi I, Rotondo JC, Mazziotta C, Montesi M, et al. *Adult Stem Cells for Bone Regeneration and Repair. Front Cell Dev Biol.* 2019;7(November):1–15.

2.3 INGENIERÍA TISULAR

El tejido óseo es de los pocos tejidos capaces de regenerarse por completo después de una lesión traumática. No obstante, algunas patologías óseas en los que el tratamiento clínico actual no es suficiente podrían verse beneficiadas por la ingeniería tisular. Este término fue acuñado en el congreso de la Fundación Nacional de la Ciencia en 1987. En su definición estaba implícito el uso de células vivas, biomoléculas y biomateriales y es un campo multidisciplinar donde se compenentran la biología molecular, la bioingeniería y la medicina. La ingeniería tisular estudia los procedimientos orgánicos como la autoreparación, tratando de imitarlos y reproducirlos con materiales sintéticos. Las MSCs se cultivan en una matriz tridimensional enriquecida con factores de crecimiento y se crean tejidos *in vitro* cuyo objetivo es reparar o incluso mejorar las funciones del tejido cuando el organismo no es capaz. A diferencia de las otras dos maneras de administración de MSCs, esta forma se desarrolla con el objetivo de poder

ayudar en la regeneración de defectos óseos grandes o en complicaciones de fracturas donde la inyección local es ineficaz(19,32).

La ingeniería tisular se soporta en cuatro pilares fundamentales: *scaffolds*, MSCs, factores de crecimiento y estimulación mecánica (**Figura 9**). Vamos a ver cada uno de estos elementos.

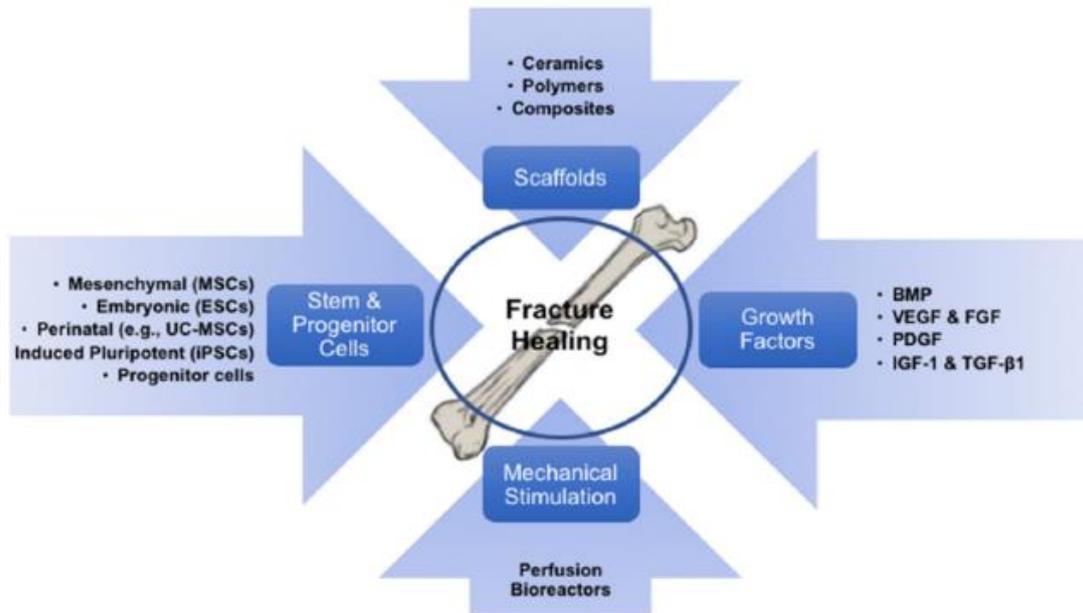


Figura 9: The diamond concept: Pilares fundamentales de la ingeniería tisular del tejido óseo que involucran: células, biomateriales/scaffolds, factores de crecimiento y la exposición requerida a la estimulación mecánica. Perez JR, Kouroupis D, Li DJ, Best TM, Kaplan L, Correa D. *Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. Front Bioeng Biotechnol.* 2018;6(July):1–23.

5.3.1 Scaffolds:

Consisten en una sustancia natural o sintética cuyo objetivo principal es servir como sustrato para la adhesión celular y proporcionar un soporte mecánico para la regeneración de tejido óseo nuevo(36). Los *scaffolds* o biosoportos deben tener una serie de propiedades básicas.

- **Biocompatibilidad:** Pueden incorporarse en el tejido hospedador sin estimular respuesta inmune.
- **Biodegradabilidad:** Actúan como un marco temporal para las células hasta que se genere hueso *de novo*. Durante este tiempo, el *scaffold* debe soportar las cargas, y distribuir uniformemente las tensiones(36). Una degradación rápida puede conducir a concentraciones excesivas de productos dañinos provocando reacciones tisulares lesivas. Por esta razón es importante considerar las tasas de degradación y los mecanismos de diseño de composición de los *scaffolds*(32).
- **Osteoconducción** Capacidad para guiar el crecimiento del nuevo tejido.
- **Osteoinducción:** Estimulación y reclutamiento de MSCs indiferenciadas hacia el defecto óseo y promoción de su diferenciación.

- **Bioactividad:** Promoción de las respuestas celulares deseadas: proliferación, diferenciación y deposición de la matriz extracelular por parte de las células osteogénicas.
- **Porosidad:** Para proporcionar el microambiente celular adecuado, el tamaño de poro del biomaterial utilizado es importante. Los poros permiten la transferencia adecuada de células, fluidos, factores, etc. Si son de gran tamaño, afecta negativamente a las propiedades mecánicas, pero si fueran muy pequeños generarían condiciones de hipoxia. El tamaño óptimo es entre 100 y 300 μm (41), aunque algunas revisiones indican que pueden ser beneficiosos también aquellos entre 300 y 400 μm (42).

Actualmente existen varios tipos de biomateriales. Los más utilizados en los *scaffolds* en la ingeniería tisular para la regeneración ósea son los siguientes:

Cerámicas: Son compuestos inorgánicos como hidroxiapatita (HA) y fosfatos de calcio (CaP), que poseen alta biocompatibilidad. Se utilizan normalmente en condiciones de carga compresiva, ya que tienen índices de desgaste muy bajos debido a su alta dureza. Sin embargo, son frágiles y su tasa de degradabilidad es baja. Por todo ello, se utilizan comúnmente en artroplastias(36). El uso de los biomateriales basados en CaP está limitado por su rigidez y baja osteoinductividad. Esto se puede resolver añadiendo BMP humano recombinante (rhBMPs) que mejoran el poder osteogénico de las cerámicas(43).

Polímeros: Son cadenas formadas por la unión de unidades mediante polimerización. Son muy conocidos por su capacidad para apoyar el crecimiento tisular antes de ser reabsorbidos. Se caracterizan por su rápida degradación. Pueden ser naturales o sintéticos. Cada uno de ellos con propiedades únicas con respecto a la tasa de biodegradabilidad, consistencia y biomimetismo. Pueden ser rígidos, solubles en el agua o hidrogeles. Los polímeros naturales son el colágeno, celulosa y quitosano. Por otro lado, los polímeros sintéticos incluyen ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) y ácido polilactoglicólico (PLGA). Cada uno con sus diferentes comportamientos degradables. La superficie de estos polímeros es propensa a la degradación hidrolítica. Han sido aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA)(44).

Metales: Los metales usados en ingeniería de tejidos incluyen Fe, Mg, Zn y sus aleaciones. En comparación con los polímeros, los metales tienen mayor rigidez y fuerza. Debido a su procesamiento y dureza, proporcionan un potencial de carga mayor que las cerámicas. Poseen excelentes propiedades mecánicas y estabilidad estructural, sin embargo tienen mayor rigidez que el hueso. Esta rigidez puede reducirse aumentando la porosidad. La falta de integración en el tejido huésped son inconvenientes, aunque menos relevantes(45).

Composites: Los *scaffolds* compuestos o composites se diseñan para aprovechar las propiedades clave de cada material. Suelen estar formados por combinaciones de, al menos, por dos materiales. Se suelen combinar polímeros naturales o sintéticos con componentes inorgánicos como las cerámicas(46). También existen combinaciones de cerámicas con metales o polímeros y metales(47).

Matriz ósea extracelular: La matriz ósea extracelular (ECM) contiene factores de crecimiento como BMPs, VEGF y PDGF y citocinas proinflamatorias. Por estas características se puede considerar como un potencial biomaterial. El tejido extirpado debe someterse a descelularización, proceso que permite eliminar las células sin destruir los componentes esenciales. Luego, esta matriz des-celularizada (dECM), que mantiene la geometría original del tejido óseo, puede utilizarse como *scaffold*. Además, debido a que el ADN celular se elimina casi por completo durante la descelularización tiene un menor riesgo de activar la respuesta inmune(48). Una de las principales limitaciones de dECM es la falta de procedimientos estandarizados para su obtención y su limitada disponibilidad. Además, las condiciones empleadas en el proceso desde la obtención hasta la descelularización pueden influir en la calidad de dECM, lo que da como resultado diferencias entre lotes incluso dentro del mismo tipo de tejido.

5.3.2 Factores de crecimiento:

Los factores de crecimiento se encuentran generalmente en la ECM ósea, y se liberan activamente después de una lesión jugando un papel crucial en la reparación ósea. Su uso terapéutico se basa en la hipótesis de que a través de una señalización adecuada inducen y aceleran el proceso de consolidación ósea. Su incorporación dentro o en las superficies de los *scaffolds* puede promover la formación ósea. Estos factores impulsan la proliferación y actividad de osteoblastos, actuando como estímulos osteoinductivos y la formación angiogénica induciendo al creación de nuevos vasos sanguíneos(49).

BMPs: Descubiertas hace más de 50 años como agentes inductores de formación ósea. Forman parte de la superfamilia de TGF- β . Hasta la fecha se han identificado más de 20 tipos y se ha demostrado que desempeñan varias funciones importantes en la inducción de la osteogénesis. BMP2 y BMP7 son los únicos aprobados por la FDA para uso clínico(36).

A pesar de su utilidad, el uso de estos factores presenta ciertos inconvenientes, como su vida media corta y su elevado precio. Además, debido a sus propiedades osteoinductivas pueden dar lugar a osificaciones heterotópicas(50).

VEGF y FGF-2: Cuando una fractura interrumpe el suministro de sangre, es necesario volver a vascularizar el área dañada para atraer pericitos osteoprogenitores que promuevan la formación ósea. VEGF es un mediador fundamental en la angiogénesis de la consolidación ósea. El crecimiento de los nuevos vasos sanguíneos permite la entrega de progenitores mesenquimales que se diferenciarán en osteoblastos. Este proceso se ve estimulado aún más por el efecto quimiotáctico de VEGF sobre las MSCs. También se ha descubierto que VEGF induce la diferenciación de las células progenitoras en osteoblastos a través de la secreción de factores de crecimiento por parte de las células endoteliales.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF): Inducen la diferenciación de MSCs a fibroblastos, osteoblastos y otro tipo de células. Pueden inducir la expresión de VEGF en el lugar de lesión promoviendo la angiogénesis. También son quimiotácticos para las MSCs y presentan efectos mitogénicos. La FDA ha aprobado la combinación de PDGF humana recombinante combinado con CaP para defectos óseos en el campo

periodontal. La implementación de PDGF en tratamientos para pseudoartrosis o fracturas requiere de más investigaciones(51).

5.3.3 Estimulación mecánica:

El método de siembra de MSCs en biomateriales biológicos y sintéticos junto a factores de crecimiento, ha sido un gran avance en el campo de la ingeniería tisular. Sin embargo, el tamaño de las construcciones que se pueden crear en condiciones estáticas está muy limitado debido a la restricción de la difusión de los nutrientes que llegan a las células óseas, las cuales tienen unos requisitos metabólicos elevados(52). El cultivo celular en construcciones 3D presenta desafíos en la entrega de nutrientes y eliminación de sustancias de desecho, al igual que el suministro de oxígeno. Una solución a este problema es el uso de biorreactores de perfusión que pueden eficazmente diseminar nutrientes y oxígeno en el producto de ingeniería tisular(36). Además del transporte convectivo de nutrientes y residuos, el flujo dinámico de los biorreactores de perfusión crea un estímulo mecánico que mejora la osteogénesis y depósito mineral de células en el injerto. Los biorreactores son útiles en el control del microambiente de las células in vitro y al mismo tiempo facilita el transporte masivo de oxígeno y nutrientes permitiendo que se desarrolle las construcciones 3D(53).

2.4 VENTAJAS DE LA INGENIERÍA TISULAR SOBRE TERAPIAS CONVENCIONALES

Los injertos óseos son la intervención más común y el *Gold Standard* en Cirugía Ortopédica y Traumatología para tratamientos quirúrgicos de retrasos de consolidación, pérdidas óseas masivas o para conseguir artrodesis. Los **autoinjertos óseos**, procedentes mayoritariamente de hueso cercano a la zona receptora, poseen capacidad osteoconductiva, osteoinductiva, osteogénica y son histocompatibles(49). Sin embargo, presentan limitaciones como la cantidad disponible, la morbilidad de la zona donante y el aumento del tiempo quirúrgico. Una solución a la falta de disponibilidad son los aloinjertos, pero tienen unas características biológicas más pobres. Menor osteoconductividad, osteoinductividad y no presentan osteogenicidad, ya que en el procesado se elimina la mayor parte del componente celular. Además de tener menos capacidades biológicas, presentan limitaciones por el riesgo de contaminación infecciosa(40,54).

La ingeniería tisular es una gran alternativa ya que, gracias a ella, podemos crear sustitutos de los injertos autólogos, sin los problemas de disponibilidad. Provocan menor número de infecciones relacionadas con la cirugía, menor morbilidad y mortalidad(49). Es una buena opción, sobre todo en pacientes ancianos que no solo poseen menor cantidad de MSCs sino que además sus MSCs cuentan con menor potencial regenerativo(31).

3.PATOLOGÍAS DONDE LA REGENERACIÓN ÓSEA JUEGA UN PAPEL IMPORTANTE

En la práctica clínica podemos encontrar una serie de enfermedades en las que se ve afectada la regeneración ósea. Entre ellas destacan por su incidencia la osteonecrosis de la cabeza femoral, la pseudoartrosis o la osteoporosis (OP). Aquí es donde la ingeniería tisular puede tener un papel relevante en la mejora de los tratamientos disponibles actualmente.

3.1 OSTEONECROSIS

Conocida también como necrosis avascular o aséptica, es una patología ósea de origen multifactorial. Se caracteriza por la muerte celular del tejido óseo debido a la interrupción del aporte sanguíneo y disrupción del microambiente, provocando una pérdida funcional del hueso. Las zonas más afectadas son la cabeza femoral y la humeral, aunque puede afectar a cualquier hueso. La más descrita y estudiada, debido a su frecuencia y a la gran incapacidad que genera, es la osteonecrosis de la cabeza femoral (ONCF)(55).

Osteonecrosis de la cabeza femoral

Es una enfermedad muy limitante. La cabeza del fémur presenta unas características anatómicas singulares y una vascularización precaria que hace que sea una zona propensa a la isquemia. El inadecuado aporte sanguíneo a la cabeza femoral, afecta al hueso, la médula y, al final de la enfermedad, al cartílago articular(55).

Etiología

Se diferencian aquellas de origen postraumático y de origen no traumático. Las postraumáticas pueden ocurrir por luxación o fractura de cadera. Según el desplazamiento inicial, el tiempo para reducirla y/o el proceso quirúrgico que requiera, habrá mayor o menor falta de flujo.

Dentro de las no traumáticas se distinguen las primarias o idiopáticas y las secundarias. Las idiopáticas suele darse en jóvenes activos entre 20 y 50 años donde no se identifica ningún factor de riesgo. Las secundarias están relacionadas con diferentes enfermedades o condiciones sistémicas. Entre un 75% y 90% de las no traumáticas, son casos relacionados con el uso crónico de corticoides, alcohol o tabaquismo(56). Otros factores son desórdenes metabólicos, condiciones hiperbáricas, lupus eritematoso sistémico, anemia de células falciforme o enfermedades autoinmunes como vasculitis. La predisposición genética parece ser una pieza clave ante la exposición a otros factores para el desarrollo. Existen varios polimorfismos descritos, asociados a una herencia autosómica dominante, que provocan alteraciones en el metabolismo del colágeno tipo 2(57).

Etiopatogenia

La regeneración y reparación ósea es constante y requiere un suministro sanguíneo continuo. Si se detiene el aporte sanguíneo, se detiene la renovación ósea debido a la muerte de elementos de la MO. Esto produce una detención de la actividad renovadora ósea debido a la muerte de elementos de la medula ósea(58). Histológicamente después del infarto, se inicia la formación de la esclerosis ósea, se engrosan los márgenes de la zona necrótica. Si esta lesión necrótica está en la región de carga, se producen microfracturas que no consiguen ser reparadas. Al no ser reparadas, el hueso es incapaz de soportar las cargas, impidiendo la consolidación de las fracturas iniciales, terminando en una fractura subcondral que se extiende progresivamente y no puede repararse por la falta de aporte sanguíneo. Entonces se produce un hundimiento y colapso de la arquitectura ósea dando lugar a una deformidad (se aplana la cabeza) de la superficie articular. Esta incongruencia provoca una destrucción del cartílago articular debido a fricción, erosión con el acetábulo, y una serie de procesos degenerativos y/o artrosis provocando la clínica. El ciclo se repite y se deteriora la estructura de la articulación cada vez más hasta que hay una destrucción articular total(55).

Clínica – Historia natural

En fases iniciales la enfermedad es asintomática. Más adelante los pacientes presentan dolor inguinal irradiado a muslo, limitación de la flexión y de la rotación interna. Se dan bloqueos articulares producidos por fragmentos libres e impotencia funcional. Movimiento restringido a la abducción y rotación interna(58).

Diagnóstico

El diagnóstico precoz puede afectar significativamente a la historia natural de la enfermedad. La radiografía simple tiene baja sensibilidad para el diagnóstico en estadios iniciales. Por otro lado, la resonancia magnética es el *Gold Standard* para el diagnóstico en esos estadios pudiendo mostrar cambios antes de la clínica(55).

Tratamientos ya existentes. Necesidad de investigar en la terapia celular

El tratamiento es individualizado. El objetivo principal es prevenir el colapso y recuperar funcionalidad. La investigación en este área se centra en mejorar el diagnóstico precoz, disminuir las complicaciones quirúrgicas e investigar tratamientos que promuevan el remodelado óseo.

Se han descrito de tratamientos quirúrgicos como la descompresión central, el injerto óseo estructural, la osteotomía y finalmente la artroplastia total de cadera(55), aunque este último es el tratamiento más eficaz en etapas terminales. Los resultados de prótesis total de cadera en adultos jóvenes o poblaciones activas, presentan complicaciones a largo plazo como el aflojamiento, desgaste de componentes o infección, además de ir acompañado de complicaciones quirúrgicas(59). Es por ello que hoy en día, se sigue buscando el tratamiento ideal para conseguir optimizar el resultado de las fases iniciales. Tratamientos que permitan detener la progresión hacia el colapso y preservar la cadera.

La aplicación combinada de MSCs junto a una intervención quirúrgica habitual, como la descompresión central, es una posible opción terapéutica(60). El proceso de reparación incluye la diferenciación de MSCs preexistentes. Se considera que la patogenia está relacionada con las MSCs de la medula ósea ya que estas presentan una disminución de su capacidad proliferativa y osteogénica. La capacidad de formar colonias de las células progenitoras endoteliales en vasos periféricos disminuye, y la capacidad de secretar el factor de crecimiento vascular VEGF también disminuye, lo que resulta en la ausencia de irrigación sanguínea el arena de necrosis. También hay que tener en cuenta la lipotoxicidad, que caracteriza a las ONCF inducidas por esteroides, ya que hay una tendencia hacia la vía adipogénica a expensas de la osteogénica, disminuyendo la cantidad de osteoblastos(61).

Es por todo ello, que la terapia celular se ha convertido en una posible alternativa terapéutica para preservar la articulación.

3.2 PSEUDOARTROSIS

De acuerdo con la FDA, la pseudoartrosis es una fractura ósea que no consolida tras 9 meses y que no ha mostrado cambios radiológicos los últimos 3 meses(62).

En la actualidad, se estima que entre un 5 y un 10% de las fracturas óseas pueden desarrollar una pseudoartrosis. La pseudoartrosis se puede presentar en diferentes escenarios clínicos, en diferentes lugares anatómicos. Puede aparecer hasta en un 1,6% de todas las fracturas femorales y hasta en el 18,5% de las fracturas diafisarias de tibia(63). Tienen un alto impacto económico para los sistemas sanitarios con importantes costes económicos directos pero también indirectos, asociados a la pérdida de productividad y ausencia de trabajo(64,65). Las complicaciones del proceso de consolidación son multifactoriales, se pueden agrupar en:

- Generales: sexo, edad, dieta (malnutrición, déficit de vitamina D), diabetes, tabaquismo, drogas, tratamientos (glucocorticoide o quimioterapia, AINES, anticoagulante), masa muscular, OP, etc.
- Locales: tipo y severidad de fractura, existencia de infección, politraumatismo, inestabilidad de la fractura por falta de fijación, vascularización pobre, etc.

Etiología - Clasificación

Existen varias formas de clasificar las pseudoartrosis. Es importante distinguir si es de origen infeccioso o no. Se considera séptica aquella que no ha consolidado porque un infección lo impide. Mientras que la aséptica, basándose en el aspecto radiológico, se puede dividir en atrófica o hipertrófica. El mecanismo patológico de los dos tipos es muy diferente(62):

- **Atrófica:** Los rasgos radiológicos característicos son: la ausencia de callo, el estrechamiento de los extremos óseos y falta de puentes óseos entre ellos(66). Hay una alteración multifactorial en las primeras fases de la regeneración ósea. Suele darse por una combinación de factores. Tanto inestabilidad del foco de fractura como

incapacidad biológica, generalmente asociada a vascularización pobre del foco de fractura(66,67). Mathieu y cols.(68) compararon la función y cantidad de BM-MSCs y células progenitoras endoteliales en pseudoartrosis atróficas y pacientes sanos. Los pacientes con pseudoartrosis mostraron un grupo reducido de BM-MSC y cambios de niveles séricos de quimiocinas y factores de crecimiento necesarios para el reclutamiento y proliferación de las células.

- **Hipertrófica:** Radiológicamente, presenta un callo grande, ensanchado hacia el espacio de la fractura con un área radiotransparente, en pata de elefante. Como en este caso se mantiene la actividad biológica, el tratamiento principal consiste en conseguir una estabilización adecuada. El callo cartilaginoso no se mineraliza porque el callo es inestable biomecánicamente(66).

Diagnóstico

El diagnóstico clínico consiste en dolor y movilidad anormal en el foco de fractura. Los hallazgos clínicos se complementan con los radiológicos, ya descritos.

Tratamiento

El objetivo es la consolidación ósea, alineación correcta y recuperar la funcionalidad. Podemos dirigir el tratamiento según el tipo de pseudoartrosis. Asimismo, hay que tener en cuenta qué hueso está afectado, la calidad ósea, hábitos y comorbilidades del paciente. Para tener en cuenta los múltiples factores de esta enfermedad, Calori y cols.(69) desarrollaron un sistema de puntuación llamado *Non-Union Score System* (NUSS). Validada posteriormente varias veces en 2011(70) y 2014(71). Reconoce 4 grupos según su severidad. Con la puntuación de NUSS el cirujano puede decidir cuál será el planteamiento terapéutico. Cuanto más grave sea el problema, más complejo es el tratamiento que requiere. Desde un cambio del sistema de fijación, hasta la amputación o artrodesis. En los grupos intermedios se puede plantear injerto óseo junto a fijación externa o productos biotecnológicos incluyendo *scaffolds*, células y factores de crecimiento, de acuerdo con los principios de la ingeniería tisular.

El *Gold Standard* para tratar la pseudoartrosis atrófica es el autoinjerto obtenido de la cresta iliaca(72). En vista de las desventajas tanto del autoinjerto como aloinjerto, la ingeniería tisular ha tomado el relevo en la investigación terapéutica de la pseudoartrosis. De acuerdo con el *diamond concept*, las MSCs toman un papel crucial en la reparación ósea, por lo tanto, la terapia celular puede ser una alternativa al autoinjerto(62).

Los ensayos clínicos en humanos se llevan desarrollando desde hace tiempo. El primer ensayo en humanos fue en 2002 dirigido por Hernigou(73). El tratamiento más estudiado y con muy buenos resultados es la combinación de descompresión central junto a BM-MSCs autólogas. Así lo expresa la última descripción sistemática de la superposición de meta-análisis desarrollado por Madhan Jeyaraman y cols.(60).

3.3 OSTEOPOROSIS

La OP es una enfermedad sistémica caracterizada por un deterioro cuantitativo y cualitativo de tejido óseo que, a la larga, provoca mayor riesgo de fractura. Se clasifica como primaria (causa desconocida) y secundaria (con etiología rastreable). La primaria se divide en la tipo I postmenopáusica (entre los 50 y 70 años) y la tipo II relacionada con la edad (personas mayores de 70 años). Entre las causas de OP secundaria se encuentran: hipercortisolismo, hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, abuso de alcohol e inmovilización prolongada de una extremidad(74).

El diagnóstico se basa principalmente en la densitometría, que refleja la densidad mineral ósea (DMO) de las vértebras lumbares y cuellos femorales(75). En esa prueba se obtiene un T-Score que indica la cantidad de hueso que tiene el paciente en comparación con un adulto joven del mismo sexo. La definición de OP unificada de la OMS es: paciente con un T-Score menor de -2,5 desviaciones estándar (DE) de la media de las personas adultas jóvenes; mientras que si el T-Score está entre -1 y -2,5 DE de la media de la población joven del mismo sexo que el paciente se clasifica como osteopenia. En la práctica clínica esta definición es poco útil debido a que muchas fracturas por fragilidad se producen en pacientes con un T-score mayor de -2,5 DE. Es por ello que la *National Bone Health Alliance* ha propuesto considerar el diagnóstico de OP a las mujeres postmenopáusicas y a los varones > 50 años con fractura por fragilidad de fémur (independientemente de DMO), así como la fractura vertebral, de húmero o de pelvis, si se acompaña de baja masa ósea(76,77).

Actualmente la prevalencia en Europa de OP en personas mayores de 50 años es de aproximadamente el 15%. Alrededor del 21 % de las mujeres entre 50 y 84 años tienen OP, lo que significa un total de 22 millones de mujeres(78). Un estudio en el 2010(79) determinó que 2,4 millones de españoles (1,9 mujeres y 0,5 hombres) mayores de 50 años padecían OP, y como consecuencia de ella, se produjeron 204.000 nuevas fracturas y se gastaron 2.842 millones de euros, que equivale al 2,8% del gasto sanitario español. Para el 2025 se estima un aumento de la incidencia de fracturas de 40% y un aumento de costes del 30%(80). Con el envejecimiento demográfico, el aumento de la incidencia de la OP y sus complicaciones, esta enfermedad es reconocida como un problema de salud pública muy importante.

El tratamiento principal consiste en medidas higiénico-dietéticas como el ejercicio físico, dieta o complementos vitamínicos como vitamina D y calcio. El tratamiento médico consiste en la estimulación de la osteogénesis o inhibición de la resorción ósea a través de fármacos(81). Los bifosfonatos consiguen disminuir la resorción ósea al promover la apoptosis de los osteoclastos. Sus efectos secundarios son la osteonecrosis mandibular, esofagitis o fracturas atípicas de fémur. Se dispone también de otros fármacos antirresortivos como el Denosumab. Es un anticuerpo monoclonal que bloquea RANK-L. Es de elección en mujeres postmenopáusicas con alto riesgo alto de fractura. Sin embargo, también se acompaña de efectos secundarios como erupciones cutáneas, cataratas, mayor predisposición a infecciones, ON mandibular o fracturas si se retira el fármaco de manera no escalonada. Otra opción es la teriparatida, una forma recombinante de la hormona paratiroidea. Es un fármaco osteoformador que se pauta en OP graves. Su mayor efecto secundario es la formación de osteosarcomas. Existe la

opción de moduladores de los receptores de estrógenos (SERM). No son especialmente potentes a la hora de mejorar la masa ósea pero sí de disminuir el riesgo de fractura. Son útiles en mujeres con una OP leve.

Los tratamientos médicos tienen dos inconvenientes: no pueden revertir la pérdida ósea ya existente; y por otro lado, todos tienen efectos secundarios graves. La OP es un problema grave de salud pública. Por este motivo se sigue investigando en un tratamiento más eficaz. En este contexto, el uso de MSCs podría llegar a convertirse en una terapia de primera línea mejorando la calidad y funcionalidad ósea sin provocar efectos nocivos como lo hacen los actuales tratamientos.

4. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN DESCRITOS PARA LA EVALUACIÓN DE MSCs

4.1 GENERALIDADES DE MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA REPARACIÓN ÓSEA

Los resultados obtenidos *in vitro* proporcionan información acerca de la citotoxicidad, genotoxicidad, proliferación y diferenciación celular. Son un primer paso en la investigación de nuevos tratamientos, pero sus resultados son difíciles de extrapolar, ya que su capacidad de recrear el entorno *in vivo* es muy limitada y son incapaces de predecir el desempeño clínico. En cambio, los modelos preclínicos *in vivo* reproducen una situación clínica real. Su mayor ventaja reside en la capacidad de evaluar la biocompatibilidad de los materiales de la ingeniería tisular, en condiciones más complejas similares a la clínica. Además permiten obtener resultados sobre la cinética y distribución de fármacos, agentes bioactivos, de la biocompatibilidad y de las propiedades de los materiales utilizados(82). El uso de modelos animales es necesario para comprobar la seguridad y eficacia de las nuevas terapias antes de iniciar su uso en clínica(83).

Hay una serie de factores que deben tenerse en cuenta al seleccionar un modelo animal específico. El principal es que el modelo demuestre procesos fisiológicos y fisiopatológicos que imiten a los de los humanos. La anatomía y fisiología del animal deben ser adecuadas para los requisitos del estudio. El animal elegido debe estar disponible, ser económico (tanto el coste del propio animal como de su mantenimiento) además de ser fácil de mantener (mínimos requisitos de vivienda, fácil manejo y tolerancia al cautiverio)(84).

Toda la experimentación animal está sujeta a controles éticos estrictos y rigurosos. Los investigadores son responsables del uso apropiado de los animales. El principio de las 3R fue introducido hace más de 60 años y establece los estándares aceptados para investigar con animales. Son el remplazo, la reducción y el refinamiento(82).

Entre las limitaciones de los modelos animales se encuentran las posibles diferencias con el hueso humano en la estructura micro o macroscópica, en la composición del hueso o en el remodelado.

Existen diferentes tipos de modelos animales para la investigación en ingeniería tisular en ortopedia. Hay dos grandes grupos que se dividen en pequeños o grandes mamíferos. Los pequeños mamíferos como las ratas o ratones se emplean principalmente en estudios de viabilidad y evaluación de biomateriales, biocompatibilidad, osteoconductividad y osteoinducción de los materiales sustitutivos óseos. Entre sus ventajas se encuentran: su fácil manejo, bajo coste, tienen unos requisitos mínimos de vivienda, y por lo tanto muy rentables. Sin embargo, poseen grandes diferencias con el hueso humano en la composición y comportamiento del tejido óseo. Por ejemplo, los huesos de los roedores tienen una corteza delgada y frágil en los huesos largos, no tienen cierre fisarios y no poseen remodelación ósea de tipo Harversiano(82).

Por otro lado, los grandes mamíferos como el conejo, la oveja, el cerdo o el perro, al ser más grandes permiten llevar a cabo procedimientos quirúrgicos complejos, el uso de *scaffolds* de mayor tamaño, similares a los que se utilizarían en la clínica y además permiten el estudio de cargas que se asemejan al ser humano. Algunas de sus desventajas frente a los pequeños son una menor disponibilidad y conllevan mayor coste tanto en su obtención como en su mantenimiento(82).

Cada animal tiene sus ventajas y desventajas. Según la enfermedad y tratamiento a estudiar en cada experimento deberemos tenerlas en cuenta y saber cuál es el modelo animal óptimo que se debe utilizar. Los modelos animales nos permiten entender el proceso patológico a estudiar y a su vez, nuevos tratamientos sobre esa patología de manera preclínica para poder trasladarlo al ser humano. Se busca generar una situación lo más similar a la clínica, sin embargo, no son situaciones equivalentes. Normalmente los animales utilizados están sanos, con una capacidad regeneradora ósea óptima, a diferencia de los humanos, los cuales pueden sufrir una serie de comorbilidades o enfermedades sistémicas que hagan mucho más variable el entorno biológico que el de los modelos. Como resultado, el desempeño en la clínica a menudo puede alejarse de las predicciones preclínicas cuando estos factores adicionales se agregan(83).

A pesar de estas limitaciones, la evaluación preclínica de nuevas opciones de terapia utilizando modelos animales son un pilar central en la ingeniería de tejidos.

4.2. MODELOS ANIMALES DE OSTEONECROSIS DE LA CABEZA FEMORAL

Técnicamente es fácil inducirla, sin embargo, es difícil desarrollar un modelo animal que reproduzca el rango completo de la enfermedad, desde la etapa más temprana hasta el episodio final de colapso.

Existen dos grupos de formas de inducción de ONCF en animales: las traumáticas y no traumáticas. Los modelos traumáticos pueden ser inducidos por privación quirúrgica vascular, por agresión física o química. Su mayor ventaja es que se pueden lograr lesiones necróticas concentradas en la cabeza femoral y un amplia gama de etapas de la ON(85).

Por otro lado, las no traumáticas pueden ser espontáneas, por ingesta de alcohol, por inyección intramuscular o subcutánea de corticoides, por administración de corticoides en combinación con otras formas de inducción como la inyección intravenosa de liposacáridos (LPS) o junto a formas quirúrgicas. En este caso, su mayor ventaja es que la etiología es similar a la de la mayoría de los casos que se observan en la clínica. Sus desventajas es que sólo se desarrolla una ON en etapa temprana y las lesiones necróticas se producen en la metafisis en lugar de concentrarse en la cabeza femoral(85).

La inducción por esteroides puede conseguir una alta incidencia de ONCF, pero a expensas de una alta mortalidad. Si se asocian los corticoides con los lipopolisacáridos, como demuestra Qin y cols.(86) en conejos, se obtiene una incidencia alta además de reducir la mortalidad. La inducción combinada de esteroides y privación vascular quirúrgica (87) puede lograr una mayor incidencia de ON que cualquier otro método solo (85).

Los modelos bípedos frente a los cuadrúpedos tienen la ventaja de que la carga sobre la articulación es más parecida a la de los humanos. Entre los diferentes animales que veremos a continuación, hay que destacar al emú. Es un animal bípedo, con un tamaño y una cadera muy similar al ser humano, que lo convierte en un modelo ideal. Conzemius y cols.(88) fueron los primeros en demostrar el potencial de este modelo para imitar la progresión de la ON hacia el colapso articular y la reproducción histológica de todos los estados de la ONCF. Los autores desarrollaron un modelo de ONCF utilizando cirugía. Esta cirugía consiste en la agresión criogénica combinada con ligación vascular.

Otro modelo prometedor, aunque en este caso cuadrúpedo, es la oveja. Estos animales presentan un carga y tamaño similares de la articulación coxofemoral humana. Además, histológicamente, se ha descrito que al envejecer, su estructura ósea se transforma en una estructura osteonal. Las extremidades posteriores, se pueden comparar a los humanos ya que las fuerzas biomecánicas poseen un vector similar a las extremidades inferiores del ser humano(89).

A pesar de la gran cantidad de investigaciones, el modelo ideal aún no existe. Existe gran variabilidad de estudios preclínicos con diferentes modelos, diferentes formas de inducción y diferentes terapias celulares según se utilicen MSC autólogas o alogénicas, de medula ósea o de cualquier otro tejido. Es por ello, por lo que en este trabajo se intenta agrupar los trabajos más relevantes que evalúan el uso de MSCs en modelos animales de ONCF.

4.2.1 Modelos animales en la evaluación de MSC en osteonecrosis

Varias investigaciones preclínicas han evaluado la efectividad de las MSCs para el tratamiento de la ONCF como por ejemplo en: conejos(90–98), perros(99–101) u ovejas(102–104) que indican que el trasplante de estas células tanto **autólogas como alogénicas** son capaces de sobrevivir, proliferar y estimular la diferenciación a osteoblastos directamente en la zona necrótica de la cabeza femoral, mejorando la

regeneración ósea. A continuación se explican las diferentes formas de administración de las MSCs en modelos animales.

- Inyección intravenosa

La inyección intravenosa logró un buen resultado en la migración y reparación del tejido dañado. Shusuke y cols.(92) estudiaron la distribución de MSCs alogénicas en conejos. Demostraron mediante inmunohistoquímica que dichas células migraban hacia el tejido dañado en un modelo de necrosis ósea. Li y cols.(90,91) también estudiaron la distribución de MSCs alogénicas tras la inyección i.v. con la misma metodología: marcaron las células *in vitro* con proteína fluorescente verde (GFP). En este estudio fueron observadas en hígado, pulmones, medula ósea, cabeza femoral normal y cabeza femoral necrótica. A las 6 primeras horas, se encontraron MSCs en los órganos nombrados, pero dónde más se concentraron fue en la médula ósea. Se estudió la cantidad de MSCs a las 2, 4 y 6 semanas, y observaron una disminución de ellas en todos los órganos, mientras que en la cabeza femoral dañada, el número aumentaba progresivamente llegando a un pico en la sexta semana, demostrando así que las MSCs pueden migrar y sobrevivir en el área necrótica de la cabeza femoral más tiempo que en los demás órganos. Aunque la vida media de la proteína GFP sea corto (4-6 semanas) es suficiente para rastrear la migración de las células implantadas durante el proceso de formación ósea. Estos dos estudios han demostrado que es factible y seguro tratar la ONCF mediante el trasplante intravenoso de MSCs alogénicas en modelos de ONCF en conejos. Sin embargo se debe continuar la investigación sobre el *homing*, ya que GFP tiene una vida media de 6 semanas, y no es tiempo suficiente para saber el efecto a largo plazo.

Aunque la patogénesis y etiología de la ONCF sigan siendo una incógnita, un factor principal es la disminución de la perfusión sanguínea a la cabeza femoral, es por eso que Li y cols.(91) y Jin y cols.(100) investigaron sobre la seguridad de la inyección intravenosa de MSCs autólogas y su capacidad de estimular la angiogénesis. Jin y cols.(100) demuestran mediante varios parámetros que la perfusión de MSCs autólogas en perros promueven la reparación vascular y la angiogénesis aumentando el suministro sanguíneo para la reparación ósea de la cabeza femoral. Para ello, midieron una serie de parámetros (mRNA de VEGF, expresión de VEGF, densidad de microvasos) a las 4 y a las 8 semanas después del tratamiento. Mostraron un aumento de la expresión de VEGF, mRNA de VEGF además de un aumento de la densidad de los microvasos mayor que el grupo control, además de una gran mejoría clínica. Algunas desventajas descritas en su artículo fueron que, aunque el modelo animal es fácil de conseguir, los perros son cuadrúpedos, con una carga mecánica en las extremidades diferentes a los humanos. Además, otros problemas por resolver son el gran número de MSCs y tiempo que se requiere para su preparación. El mismo grupo de investigadores(90) han publicado un ensayo similar, en el que se evalúa la capacidad de estimular la angiogénesis de esta técnica así como la estimulación de expresión de genes relacionados con la formación ósea, pero en conejos.

- Inyección directa

Varios estudios(29,33,40) indican que la inyección intravenosa o intraarterial puede llevar al daño de varios órganos por la aparición de microembolismos. Esta desventaja ha llevado a la búsqueda de otras vías de administración de las MSCs. Por ejemplo la **inyección directa**(93,95,99), tanto por su seguridad como por su falta de distribución en otros órganos.

Matsuya y cols.(95) y Asada y cols.(93) utilizan el mismo modelo animal: conejos a los que se les induce ONCF mediante la inyección de metil-prednisolona. En estos dos estudios se mostró, que la inyección directa de MSCs autólogas de la medula ósea cultivadas previamente *in vitro* tiene muy buenos resultados en la prevención de ONCF en estadios tempranos provocada por el tratamiento de glucocorticoides (GC) de altas dosis y corta duración. En el grupo tratado con MSCs, no se observa signos histológicos de ONCF como son lagunas vacías ni núcleos picnóticos de osteocitos en el hueso trabecular del fémur, a diferencia de los grupos control. Tampoco se observan cambios isquémicos ni apoptóticos en la médula ósea del fémur, como se observan en los demás grupos. En este modelo inducido por glucocorticoides, se observó mediante citometría, que aquellos animales en los que no se inyectaron MSC, existía un gran porcentaje de células detenidas en G1 del ciclo celular sugiriendo que los GC detienen el ciclo celular de las MSC de la medula ósea, y que la inyección de MSC autólogas suprime esta detención normalizando los ciclos celulares.

Estas dos investigaciones estudian como anular el efecto de los GC en el hueso, además de proporcionar una explicación más exhaustiva de la etiopatogenia (Figura 10) de esta forma de inducción de ONCF. Ahondan en el mecanismo mediante el que las MSCs ayudan en su prevención.

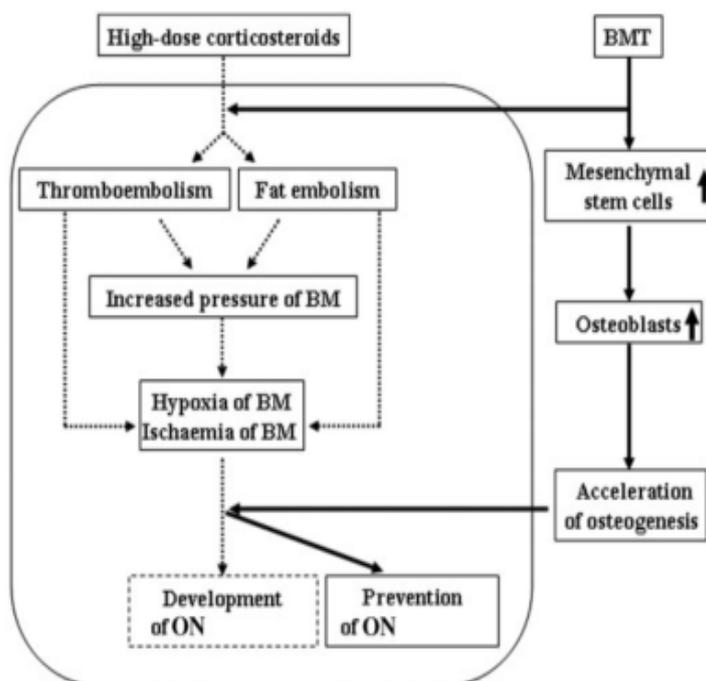


Figura 10: Las MSCs ejercen su efecto sobre las células madre, lo que conduce a la aceleración de la osteogénesis. Las MSCs reducen la formación de trombos y la embolia grasa, porque las MSCs pueden regular la fibrinogénesis y la coagulación en la sangre periférica. Como resultado, la presión de la MO disminuye y la hipoxia y los cambios isquémicos se normalizan. Por lo tanto la aceleración de la osteogénesis conduce a la prevención de la ON inducida por corticoides. Imagen obtenida de Asada T, Kushida T, Umeda M, Matsuya H, Sasai K. Prevention of corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits by intra-bone marrow injection of autologous bone marrow cells. *Rheumatology*. 2008;47:591–6.

Yan y cols.(99) llevaron a cabo un estudio de la inyección directa de MSC autólogas en un modelo canino. El principal objetivo de este estudio fue demostrar la supervivencia, proliferación y diferenciación en tejido isquémico de las MSC a osteoblastos, lo que contribuye a acelerar el proceso de regeneración ósea. Además de la supervivencia, evidenciaron histológicamente que en los grupos tratados con las MSC había mayor formación ósea, aunque los resultados de la extensión de la angiogénesis no fueron estadísticamente significativos. Por su parte, Lebouvier y cols.(105) investigaron la distribución y efectividad de las MSCs autólogas en un modelo porcino. Durante las primeras 24 horas tras el trasplante de MSCs no se encontraron en ningún otro órgano, además se observó una buena distribución homogénea de ellas por toda la cabeza femoral, siendo una forma segura de administración. La efectividad se examinó mediante RMN e histología. Se observó un inicio de curación a las dos semanas de la inyección intraósea y una recuperación completa a las 9 semanas.

- Descompresión central combinada con MSCs

Varios investigadores han evaluado la combinación de la descompresión central junto a terapia celular, añadiendo MSCs, en animales. Un modelo muy similar al ser humano en cuanto a vectores de carga y biomecánica de la articulación de la cadera es la oveja. Feitosa y cols.(104) utilizaron este animal, comparando el tratamiento con DC únicamente, o junto al uso de MSCs autólogas. Demostraron en el grupo que recibió la terapia celular, fueron implantadas con éxito mostrando una mayor velocidad de regeneración ósea. Sin embargo no pudieron confirmar si los beneficios observados se deben exclusivamente al hecho de utilizar las MSCs o a la combinación de ambos tratamientos.

Vélez y cols.(103) compararon 3 grupos diferentes de ovejas. Un grupo recibió descompresión central únicamente, otro la DC con un injerto óseo y finalmente un tercer grupo la DC junto a MSCs autólogas de la medula ósea. Al igual que en el estudio de Feitosa, se utilizaron ovejas. La ONCF fue inducida por criogenia. Este modelo consigue imitar de forma bastante fidedigna todas las etapas evolutivas de la ONCF. El 3º grupo demostró una regeneración ósea extensa. El análisis de las muestras reveló: una gran infiltración osteoide en las áreas de isquemia y necróticas. El hueso maduro estaba rodeado por un inmenso número de osteoblastos produciendo osteoide inmaduro. Se distinguió menor cantidad de fibrosis y ningún signo de formación de granuloma. Se comprobó mayor porcentaje de superficie de hueso recién formado. Este estudio concluyó que la DC combinada con MSCs, confiere mayor efectividad a la técnica quirúrgica(106).

Song y cols.(62) es otro estudio que evalúa el uso combinado de DC y MSCs autólogas de la MO. En este caso, utiliza conejos donde se les induce la ONCF mediante la inyección de LPS. Estos investigadores tratan de aportar un tratamiento a la ONCF favoreciendo la angiogénesis. Logran demostrar que los animales a los que se implantan localmente las MSCs tras la DC expresan una mayor cantidad de VEGF y BMP-2. La acción paracrina de VEGF, permite una mayor regeneración vascular alrededor de la cabeza femoral. Hay un aumento de osteoblastos alrededor del hueso trabecular y un aumento de capilares.

Yang y cols.(97) examinan la combinación de DC, MSCs y simvastatina. Revelaron mejores resultados con la combinación de los 3 tratamientos que la DC + MSCs. En este modelo de conejo inducido por glucocorticoides y LPS demuestra diferencias significativas en la relación entre lagunas vacías del hueso trabecular y la densidad de microvasos. En los resultados del estudio, descubren que el análisis de las muestras con microscopía electrónica las 8 semanas del tratamiento, el grupo que recibe la triple combinación posee una apariencia de hueso normal. Mientras que el grupo que recibe DC y MSCs posee una densidad trabecular mejor de lo normal, en el grupo que recibe DC posee trabéculas agrietadas y aquel que no recibió nada, terminó colapsando. Los resultados de esta investigación arrojan que la simvastatina puede promover la diferenciación a osteocitos y células endoteliales de las MSCs, proporcionando buenas perspectivas de esta combinación.

- Ingeniería tisular

Otra forma de implantar las MSCs en la cabeza femoral es mediante *scaffolds*. Kang y cols.(98) han demostrado sobre conejos con ONCF inducida por glucocorticoides que el uso de andamiaje de polifosfato de calcio combinado con estroncio (SCCP), sembrado de MSCs autólogas favorecen la reparación ósea. El estroncio (Sr) presenta doble acción: mejora la formación ósea mediante la estimulación de la diferenciación de preosteoblastos e inhibe la osteoclastogénesis. La angiogénesis también es importante en la ingeniería ósea y el SCPP tiene la capacidad de mejorar la adherencia y comportamiento angiogénico de las células endoteliales. El aumento de la estabilidad de la mezcla SCPP junto a la implantación de MO autóloga y la reabsorción ósea más lenta en comparación con los grupos control, permite mostrar que todo ello facilita la incorporación y remodelación ósea en hueso nuevo sin debilitamiento mecánico y así evitar el colapso de la cabeza femoral.

En este estudio demuestran *in vivo* que el uso de SCPP promueve la angiogénesis durante la regeneración ósea, además de mejorar la osteogénesis.

El SCPP ofrece resistencia mecánica inmediatamente después de ser implantado en la cabeza femoral. Las MSCs de la MO trasplantadas junto al andamio pueden diferenciarse directamente en osteoblastos o en células endoteliales promoviendo el proceso de reparación *in vivo*. El tejido óseo se regenerará sobre este compuesto. Después, el *composite* será reemplazado por hueso recién formado. A diferencia de las modalidades de tratamiento actuales, la ingeniería tisular proporcionaría apoyo estructural mientras se produce la sustitución ósea. Este biomaterial estimula la formación ósea mediante osteoinducción y osteoconducción y apoyan al hueso subcondral y cartílago articular de la cabeza femoral para el tratamiento ONFH pre-colapsado.

Caminal y cols.(102) también estudian el uso combinado de MSCs autólogas y *scaffolds*, pero en ovejas con ONCF inducida por criogenia siguiendo el mismo método que Vélez. Se analizaron dos tipos de andamios, ambos formados por partículas de tejido óseo humano cadavérico desantigenizado y liofilizado. El potencial osteogénico de las MSCs fue evaluado *in vivo*, demostrando la persistencia de las células injertadas en el

tejido huésped y su compromiso con el linaje osteoblástico mediante el seguimiento de las células marcadas con GFP.

Peng y cols.(101) aplican la ingeniería tisular en perros. En este estudio se evalúa el *scaffold* de cerámica de fosfato bicálcico (BCP) fabricado mediante técnica de laminación 3D basada en microarquitectura del hueso esponjoso. Después de sembrar MSCs autólogas de MO in vitro, la combinación fue implantada en el defecto óseo inducido por la técnica “*trap door*” en perros.

Radiológicamente no se encontraron diferencias entre el grupo que recibió solo el andamio o aquel que recibió la combinación, ya que el contorno de la cabeza no mostraba cambios. En cambio, en el grupo control que recibió únicamente autoinjerto, sí que se observó un contorno irregular de la cabeza femoral además de colapso. A nivel histológico, sí que aparecieron diferencias significativas entre los dos primeros grupos: el grupo que recibió la terapia celular junto al *scaffold*, mostró mayor osteointegración y formación ósea que los otros dos grupos. Además de manifestar mayor resistencia en la evaluación biomecánica.

El andamio de BCP biomimético preparado por laminación gel 3D presenta buena estructura, buena resistencia inicial, es biocompatible, y facilita la adherencia y supervivencia de MSCs. Favorecen la formación ósea en las superficies del andamio, lo que le convierte en un candidato adecuado como estructura de apoyo para la implantación de MSCs. Este modelo de *scaffold* presenta problemas en la interfase entre el andamio subcondral. Otro contratiempo es que el modelo canino de ONCF inducido por *trap door* no es un modelo de ON fiel a la realidad, difiriendo del ser humano. Se necesitan mejoras adicionales, más investigaciones y el desarrollo de un modelo animal mejor. Los resultados proporcionan un fuerte soporte al argumento de que el andamio de BCP sembrado con MSCs podría ser útil para estabilizar el desequilibrio entre reabsorción y la formación ósea, que caracteriza a la ONCF.

4.3 MODELOS ANIMALES DE PSEUDOARTROSIS

En la experimentación animal, se considera pseudoartrosis aquella fractura que no consolidará en la vida del animal, aunque en muchos estudios de animales pequeños, se define aquella que no consolida tras 16 semanas. Para desarrollar una pseudoartrosis en animales, primero se realiza una fractura y luego se intenta evitar esa consolidación con diferentes técnicas que veremos a continuación:

- Técnicas quirúrgicas para impedir la consolidación ósea

La fractura se puede llevar a cabo de forma cerrada o abierta. Una fractura abierta permite una mayor precisión y reproducibilidad, ya que se hará en el mismo lugar y orientación deseada. Además se puede aprovechar en el mismo acto quirúrgico la inserción de alguna técnica quirúrgica para impedir la consolidación ósea. En contraposición, algunas de sus desventajas son: mayor riesgo de infección y pérdida del hematoma fractuario. Por otro lado, si la fractura es cerrada, se conserva el hematoma y no se altera la vascularización y musculatura circundante. En contra, no tiene tanta

precisión, se pierde reproducibilidad y aumenta las posibilidades de producir una fractura conminuta(107).

- **Métodos de fijación**

Tras generar una fractura se debe elegir el método más adecuado para el experimento. Hay varias técnicas(107):

- Apoyo en el hueso paralelo: Se obtiene una estabilidad parcial de la fractura. Apenas se necesita intervención quirúrgica. Una desventaja importante es que la inmovilización es muy precaria y puede dar lugar a deformidades, falta de apoyo por dolor o movimiento excesivos.
- Fijadores externos: Se implantan lejos del foco, y así no interfieren en la evaluación biomecánica ni radiológica. Se pueden quitar fácilmente. Sus inconvenientes: riesgo de infección constante y el precio.
- Fijadores intramedulares: Con este tipo de fijación se obtiene una estabilidad del foco. Desafortunadamente, destruye la vascularización endomedular, y la retirada puede desencadenar una alteración del foco enmascarando los resultados de los estudios histológicos.
- Placas de osteosíntesis. Esta es la técnica más estable que se haya utilizado. No obstante la intervención quirúrgica que necesita aumenta el riesgo de infección, elimina el hematoma fractuario y puede dañar el periostio.

En función del objetivo de la investigación se pueden diseñar varios modelos: retraso de consolidación, pseudoartrosis hipertrófica o atrófica.

- Retraso de consolidación

Al ser un concepto aún sin definir de manera estándar es difícil saber a partir de cuándo se considera un retraso de consolidación. Es por ello, que el estudio debe tener un grupo control en el que se demuestre que el modelo finalmente se une. Para provocar ese retraso hay varias formas: inestabilidad, vascularización disminuida, materiales extraños y osteogénesis por distracción(108).

Debido a la falta de un consenso sobre la definición pocos estudios pudieron confirmar el retraso de consolidación. Sigue siendo un desafío encontrar una técnica relevante, confiable y reproducible que resulte en esta entidad(107).

- Pseudoartrosis hipertrófica

Este tipo de pseudoartrosis es consecuencia de un exceso de movimiento en el sitio de fractura, algo que se puede conseguir mediante el uso de un clavo endomedular sin tornillos de bloqueo o mediante la estabilización con el hueso paralelo.

Existen pocos modelos que hayan conseguido una pseudoartrosis hipertrófica con tasas de éxito altas. Incluso en algunos se transformaban en una atrófica rígida(107).

- Pseudoartrosis atrófica

De este tipo de pseudoartrosis se han publicado muchos modelos de experimentación. Hay múltiples razones, pero, fundamentalmente se debe a que en humanos es una enfermedad difícil de tratar, obligando a múltiples intervenciones quirúrgicas. Además, es muy fácil diseñar modelos animales de este tipo de pseudoartrosis, ya que solo hay que evitar la consolidación sin tener en cuanto el resultado radiológico o si se debe consolidar tras un periodo de tiempo como en el retraso de consolidación. En la mayoría de los modelos, se alcanza una tasa de éxito del 100%. Sobre todo hay modelos en ratas o ratones utilizando tibia o fémur, con diferentes combinaciones de osteotomía junto a modelos de fijación(107).

4.3.1 Modelos animales en la evaluación de MSC en pseudoartrosis

Para evitar las complicaciones del injerto autólogo en el tratamiento de la pseudoartrosis se están buscando alternativas. Una de ellas es la terapia celular con MSCs. A continuación se analizarán diferentes experimentos en animales que evalúan la seguridad y eficiencia del uso de MSCs, la fuente, el número de células, el momento y la forma de administración más adecuada. Los estudios descritos a continuación, proporcionan evidencias de que la terapia celular es un abordaje prometedor en el tratamiento de la pseudoartrosis en modelos animales.

- *Inyección directa*

Galhardo y cols.(109) utilizaron un modelo de pseudoartrosis en perros. La fractura se estabilizó con una placa de osteosíntesis. Las MSCs alogénicas obtenidas del tejido adiposo, se aportaron mediante inyección percutánea en el foco de fractura. El grupo tratado con terapia celular demostró una reducción de la tasa de complicaciones y un proceso más rápido de reparación ósea en comparación con el grupo control. Los autores tuvieron 3 casos de complicaciones graves y una leve. Las graves (un 8,3% del total de perros) consistieron en la migración intraarticular de los tornillos en la rodilla, mientras que la leve consistió en una leve formación de seroma en la incisión quirúrgica. En el seguimiento postoperatorio no se encontró ninguna reacción o rechazo inmune.

Tawonsawatruk y cols.(110) publicaron un estudio preclínico sobre pseudoartrosis atrófica inducida en un modelo murino, en el que se analiza la acción de MSCs xenogénicas de la MO y pericitos del tejido adiposo, ambas del ser humano. El modelo de pseudoartrosis se llevó a cabo mediante una fractura tibial junto eliminación del periostio que luego se estabilizó con un fijador externo. A las 8 semanas, el 80% de las ratas que se encontraban en los grupos tratados con MSCs, mostraron evidencia de consolidación ósea en comparación con el grupo control, donde solo consolidaron un 14% de las fracturas. En este mismo periodo de tiempo, radiológicamente, se observó mayor radio-opacidad en el foco de fractura y un callo de fractura mayor que en el grupo control. En las pruebas histológicas, se confirmaron puentes óseos en los dos grupos que recibieron tratamiento. La calidad ósea medida por micro-CT y las pruebas mecánicas resultaron ser mejores en ambos grupos frente al control. En conclusión, tanto las MSCs de MO como pericitos de tejido adiposo tienen un potencial de regeneración ósea

significativo, siendo una técnica terapéutica con alto potencial de cara a tratar aquellas fracturas con alto riesgo de complicarse en una pseudoartrosis.

- *Inyección sistémica*

El estudio de Jiang y cols.(111) explora la posibilidad de utilizar MSCs autólogas de MO combinadas con PTH₁₋₃₄ para el tratamiento de las fracturas y sus complicaciones. El modelo utilizado fueron ratones. Se fracturó el fémur y se estabilizó con fijación interna. Se utilizó un clavo endomedular insertado a través del tendón rotuliano. Se dividieron los animales en 4 grupos: suero (control), PTH₁₋₃₄, MSC y 1-34 PTH₁₋₃₄ +MSC.

El volumen del callo óseo fue mayor en aquellos tratados con PTH₁₋₃₄, independientemente si se había combinado el tratamiento con MSC o no. Sin embargo, el callo fue más duro en aquellos ratones que recibieron el tratamiento combinado. Todo ello sugiere que PTH₁₋₃₄ promueve el incremento de óseo pero no promueve tanto la mineralización ósea como las MSCs. La angiogénesis, analizada con Micro-CT, muestra que el grupo PTH tiene mayor cantidad de vasos en el callo de fractura, mientras que el grupo MSC tiene vasos de mayor diámetro.

La PTH₁₋₃₄ mejora la proliferación y diferenciación de las células endoteliales y de las MSCs, mejorando la migración de las MSCs hacia el callo óseo y promueve la angiogénesis y osteogénesis facilitando la consolidación ósea. Este estudio proporciona evidencias de que el uso de PTH₁₋₃₄ puede ser atractivo en terapias diseñadas para el tratamiento de las pseudoartrosis.

Huang y cols.(112) fueron los primeros en comparar la forma de administración de MSCs en un modelo murino de pseudoartrosis. El origen de las células fue la MO de ratas de la misma especie. Las opciones de administración a estudiar fueron la sistémica e inyección directa. A las 5 semanas, ambos grupos mostraron que los extremos de la fractura se habían unido mientras que en los grupos controles no. También demostraron las mismas propiedades mecánicas, las cuales fueron mejores que en los grupos control. Sin embargo, en el análisis inmunohistoquímico se apreció una menor cantidad de MSCs y osteoblastos en el callo de fractura del grupo en el que se inyectó sistémicamente que en el grupo de inyección local.

- *Vía SDF1-CXLR4*

En los dos siguientes experimentos, además de evaluar la inyección sistémica de MSCs, estudian la vía SDF1-CXLR4 y su papel en la migración y diferenciación celular en el foco de fractura.

Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) es considerado el factor maestro del receptor de citocinas C-X-C tipo 4 (CXCR4). SDF-1 juega un papel muy importante en la migración al lugar de lesión de las MSCs positivas para CXCR4 y regula la actividad reparadora. La función principal del periostio en la reparación ósea es la liberación SDF-1 por mecanismos paracrinos y autocrinos que conduce a la secreción de citocinas y a la diferenciación celular, lo que podría explicar su efecto promotor de las MSCs en las fracturas óseas.

Zhu y cols.(113) diseñaron un experimento en ratas en el que demostraron que la ciasterona promueve la migración y osteogenicidad de las MSCs, reduciendo así el tiempo de consolidación de la fractura. La ciasterona es un extracto de hierbas de la medicina tradicional China. El efecto sobre la migración de las MSC hacia el foco de fractura está relacionado con el aumento de la expresión del mRNA de CXCR4. Para comprobarlo, silenciaron la expresión de CXCR4, y en esos casos el efecto de la ciasterona sobre la migración de las MSCs fue inexistente.

Tras 6 semanas post-tratamiento, el volumen óseo fue analizado mediante Micro-CT, mostrando que el grupo control tenía un retraso de consolidación en comparación con el grupo tratado. Se analizó la expresión de marcadores genéticos osteogénicos en MSCs como ALP, OPN o BMP2 mediante RT-qPCR y WesternBlot. Se observó que en el grupo tratado con ciasterona había diferencias significativas.

La ciasterona puede promover el *homing* y la diferenciación osteogénica de las MSCs, también puede regular positivamente el ARNm relacionado con la migración y osteogénesis. Todos estos hallazgos pueden proporcionar una base teórica para el tratamiento de la fractura, y previniendo el retraso de la consolidación y la pseudoartrosis.

Wang y cols.(114) investigaron en qué momento es ideal la inyección de las MSCs alogénicas procedentes de la MO en un modelo de pseudoartrosis en ratones. Secundariamente estudia la importancia de la vía CXCR4/SDF-1 en la migración y diferenciación de las MSCs a la lesión. Las MSCs fueron marcadas con proteína fluorescente roja (RFP). Se inyectaron por la vena de la cola de los ratones tras la fractura los días 1,7 o 14. Un grupo control recibió AMD3100 (inhibidor de SDF-1), demostrando la importancia de la vía SDF1-CXCR4 en la consolidación ósea y la migración de las MSCs.

En la inyección del 7º día, se encontraron mayor cantidad de MSCs en el sitio de fractura y se mantuvieron durante más tiempo que los demás grupos. El volumen óseo y la densidad mineral estaban aumentadas en este grupo. Los autores concluyeron que el 7º día es el óptimo para inyectar IV las MSCs. Adicionalmente, se encontró que el grupo AMD+ MSCs presentó los mismos resultados que el grupo control en todos los parámetros confirmándose la importancia del factor SDF-1.

Ambas formas de administrarse fomentan la formación de callo óseo y mejoran las propiedades mecanismos sin observarse efectos adversos ni rechazo inmune. Aun así, quedaron varias dudas sin resolver como por ejemplo, si los mecanismos para fomentar la consolidación son diferentes en función de la forma de administrar o si en la zona de fractura se habían liberado factores de crecimiento o citocinas ya que no se estudió ningún parámetro al respecto.

Las MSCs pueden participar de manera directa en la consolidación diferenciándose en osteoblastos y también de manera indirecta regulando la inflamación, liberando factores de crecimiento o citocinas en la zona de lesión. Es por ello, que si en los parámetros radiológicos o mecanismos se observan diferencias significativas entre las formas de administrarse, pero sí hay menor cantidad de MSCs en el foco en la forma

sistémica, todo ello sugiere que la sistémica contribuye más en la consolidación de forma indirecta.

- *Scaffolds*

Según estudios clínicos previos sobre pseudoartrosis(115), la matriz ósea desmineralizada (DBM) había demostrado eficacia en su tratamiento. Dozza entonces propuso la hipótesis de que si se añadían MSCs mejorarían los resultados. Dozza y cols.(116) comparan un modelo ovino la eficacia de DBM alogénica combinada con MSCs autólogas de MO frente al tratamiento con solo DBM. Se consiguió una pseudoartrosis atrófica en ovejas. La intervención quirúrgica consistió en una fractura tibial junto a la aplicación de un clavo intramedular. Asimismo, se alteró el suministro de sangre mediante electrocauterización y escisión del periostio.

Curiosamente, no se encontraron diferencias mecánicas, histológicas o radiológicas significativas entre ambos grupos. La posible explicación a este resultado negativo la atribuyen a la falta de conocimiento de la biología de las MSCs in vivo y del microambiente que requieren.

Xue y cols.(117) utilizaron un modelo murino. Fueron los primeros en estudiar la efectividad de la combinación de un *scaffold* de gelatina de liberación local controlada de HMGB1 junto a láminas 2D de MSC alogénicas de MO. Mediante RT-PCR se evaluó la capacidad de HMGB1 de fomentar la diferenciación osteogénica de las MSCs. Se pudo observar un aumento de la expresión de *ALP*, *RUNX2*, *OCN* o *COL1A1* en los grupos gelatina+HMGB1+MSC y en gelatina+HMGB1 en comparación con el grupo que solo recibió gelatina y el grupo control que no habían sido tratados. Estos dos grupos también presentaron a las 4 semanas en el estudio radiológico, un callo de fractura más grande que los grupo control. In vitro se comprobó que al añadir HBGM1, aumenta la biocompatibilidad del *scaffold*.

Los investigadores describen las siguientes limitaciones: Por un lado, solo se controló la reparación de la fractura a las 4 y 8 semanas. Y para minimizar el número de ratas, no se investigó cambios en la calidad de la consolidación en momentos intermedios. Por otro lado, se evidenció que a largo plazo, las láminas de cultivo células de MSC indujeron senescencia celular, ya que la viabilidad celular dentro de las hojas se redujo un 10%. Sin embargo, a pesar de ello, el número de células supervivientes en las láminas seguía siendo mayor que en la inyección local.

Este estudio muestra que el *scaffold* de gelatina que libera localmente HMGB1, combinado con láminas 2d de células MSC intensifica la consolidación de las fracturas. HMGB1 estimula la consolidación mediante la vía de señalización STAT3. Las esponjas de gelatina disponibles comercialmente pueden ser una buena forma también de acelerar el proceso de reparación. Es el primer estudio que lleva a cabo esta combinación de tratamiento de ingeniería tisular, y se requieren de más estudios para poder trasladarlo a la clínica.

- Defecto óseo de tamaño crítico

En el desarrollo de modelos animales de pseudoartrosis, existe una opción que es la creación de un defecto óseo de tamaño crítico también llamado *critical sized bone defect* (CSBD). CSBD se define como aquel defecto óseo que no consolida espontáneamente a pesar de la estabilización quirúrgica y que requiere de más intervenciones para curarse. Todavía no se ha llegado a un consenso sobre el tamaño del CSBD en cada especie animal.

Hay muchas publicaciones sobre la efectividad de MSCs y *scaffolds* en modelos de CSBD. Esto es así porque la cirugía es relativamente sencilla y el defecto óseo que se crea es el ambiente ideal para la implantación de *scaffolds*. Sin embargo, su principal desventaja es que los resultados obtenidos son difícilmente extrapolables a la clínica. En humanos afortunadamente, no se dan estas pérdidas óseas tan importantes. Además, el microambiente biológico de las pseudoartrosis atróficas no se imita correctamente solo provocando un defecto óseo(118,119).

Kumar y cols.(120) evaluaron en un modelo de CSBD en conejos, la eficacia de un *scaffold* conformado por hidroxiapatita y fosfato tricálcico. Este *scaffold* fue sembrado de 4 tipos diferentes de MSCs de MO: autólogas, alogénicas, de oveja y de perro. A los 90 días, radiológicamente se observó que en los grupos que recibieron MSC autólogas y alogénicas, se había formado hueso nuevo, se había reabsorbido el andamio y existía un puente óseo completo entre ambos extremos. En los grupos que recibieron MSCs ovinas y caninas mostraron una formación de hueso nuevo similar entre ellos pero menor que los dos primeros grupos. En este caso no se evidenció ningún rechazo al injerto ni proceso inflamatorio. La evaluación histológica muestra diferencias significativas frente a los grupos control que solo había recibido un *scaffold* o que no había recibido ningún tratamiento. En el estudio histológico, los resultados del grupo que recibió MSCs autólogas fueron mejores que las alogénicas. Las alogénicas mejores que las xenogénicas. Dentro de las xenogénicas las ovinas obtuvieron mejores resultados que las caninas.

En este experimento, todos los tipos de MSCs que fueron sembrados en el biomaterial, promueven una consolidación rápida de un defecto óseo crítico, lo que sugiere que estas células son apropiadas para estimular la formación ósea en consolidación de fracturas y en pseudoartrosis.

Prat y cols.(121) demuestran viabilidad del potencial osteogénico y el uso terapéutico de la terapia celular en un modelo CSBD tibial en ovejas. Concretamente MSCs autólogas de MO sembradas sobre una matriz ósea esponjosa cadavérica obtenida del banco de tejidos. Se compara este tratamiento con el uso de autoinjerto para el tratamiento de la pseudoartrosis. En los 2 casos se observó histológicamente una actividad de remodelado óseo y vascularización. Cuando se comparan los resultados de los dos grupos, mostró mejores resultados el autoinjerto. No se observó ninguna formación de tejido ectópico ni tumorigénesis confirmando la seguridad del experimento.

Los resultados respaldan la seguridad, reproducibilidad y viabilidad de esta técnica de ingeniería tisular. Aun así, se requieren ensayos clínicos para definir los perfiles de seguridad en el ser humano y poder comprender mejor los mecanismos subyacentes en la pseudoartrosis atrófica.

4.4 MODELOS ANIMALES DE OSTEOPOROSIS

Como ningún animal desarrolla OP de forma natural, se debe inducir utilizando una técnica aislada o la combinación de varias(122). Se han diseñado modelos experimentales diferentes para el estudio de la OP postmenopáusica, la inducida por glucocorticoides o por la inmovilización(123).

Los modelos animales más populares de OP postmenopáusica se generan por ovariectomía (OVX) en ratas, ratones, ovejas y monos. El modelo más utilizado es la rata. Su corta vida útil es económicamente ventajosa y permite realizar estudios sobre el efecto del envejecimiento. La remodelación del hueso esponjoso es similar al humano y las pruebas biomecánicas se pueden realizar bajo condiciones estandarizadas. Aunque tiene similitudes con el esqueleto humano, las ratas tienen epífisis abiertas, poseen muy poca remodelación ósea intracortical y no tienen sistemas de Havers. Además poseen remodelado óseo a lo largo de toda su vida(124). La pérdida ósea aparece justo después de la operación en los ratones. En las ratas, ocurre tras 14-30 días. Las ovejas desarrollan OP a los 3-6 meses de la ovariectomía.

Alternativamente, hay modelos animales de OP logrados mediante ingeniería genética. Por ejemplo ratones *knockout* del receptor alfa estrogénico (*Esr1*). Los modelos *knockout* de *Esr1*, revelaron que *Esr1*, inhibe la resorción ósea al inducir apoptosis de los osteoclastos y mejora la formación del hueso(125,126).

Los modelos animales para la OP por inmovilización se generan por suspensión del animal por la cola o inmovilización de la extremidad mediante neurotomía ciática, tenotomía o uso de yeso en roedores o perros. La inmovilización afecta tanto a la cortical como al hueso trabecular con una disminución significativa de los parámetros de mineralización e histomorfométricos en comparación con la OP postmenopáusica. Los modelos por inmovilización no se utilizan mucho, ya que la pérdida de masa ósea suele ser local y no sistémica. Además los métodos de inmovilización de las extremidades son éticamente reprochables(124).

La OP inducida por glucocorticoides se puede estudiar en ratones, ratas, conejos, perros y ovejas. Este tipo es la más común entre las OP secundarias en humanos. El hueso esponjoso es el más afectado, y las fracturas suelen ocurrir en cuello femoral o vertebras. Sin embargo, la pérdida de hueso esponjoso no es observada de manera consistente en roedores, mientras que en animales grandes sí (123).

La FDA recomienda que los nuevos agentes farmacéuticos en el tratamiento de la OP sean evaluados en 2 especies diferentes: ratas ovariectomizadas (OVX) y en un animal no roedor de tamaño grande que posea sistema Harvesiano y remodelamiento óseo similar al ser humano(127). En general, con respecto al hueso esponjoso, los modelos de animales grandes como ovejas o perros parecen ser superiores a los modelos de animales pequeños cuyo grosor trabecular es tres veces más pequeña en la de los seres humanos(124).

4.4.1 Modelos animales en la evaluación de MSC en osteoporosis

La patogénesis de la OP se reconoce como un desequilibrio entre resorción y formación de hueso en la que la velocidad de resorción ósea es mayor que la de la formación (Figura 11). Los trastornos en el *homing*, la alteración de la capacidad de la diferenciación osteogénica y la senescencia de las MSCs son puntos clave en la patogénesis de esta enfermedad y, por lo tanto, la terapia celular con MSCs puede ser muy útil en el tratamiento de esta patología. Las investigaciones preclínicas sobre el trasplante de MSCs para el tratamiento de la OP proporcionan evidencias de mejorar la diferenciación osteogénica, aumentar la densidad mineral ósea y detener el deterioro óseo asociado a esta enfermedad (128). La inyección intramedular e intravenosa son los métodos más comunes en el trasplante de MSCs para tratar OP. Las MSCs más estudiadas proceden de MO (BM-MSCs) y tejido adiposo (A-MSCs) y el modelo más usado, la OP por OVX.

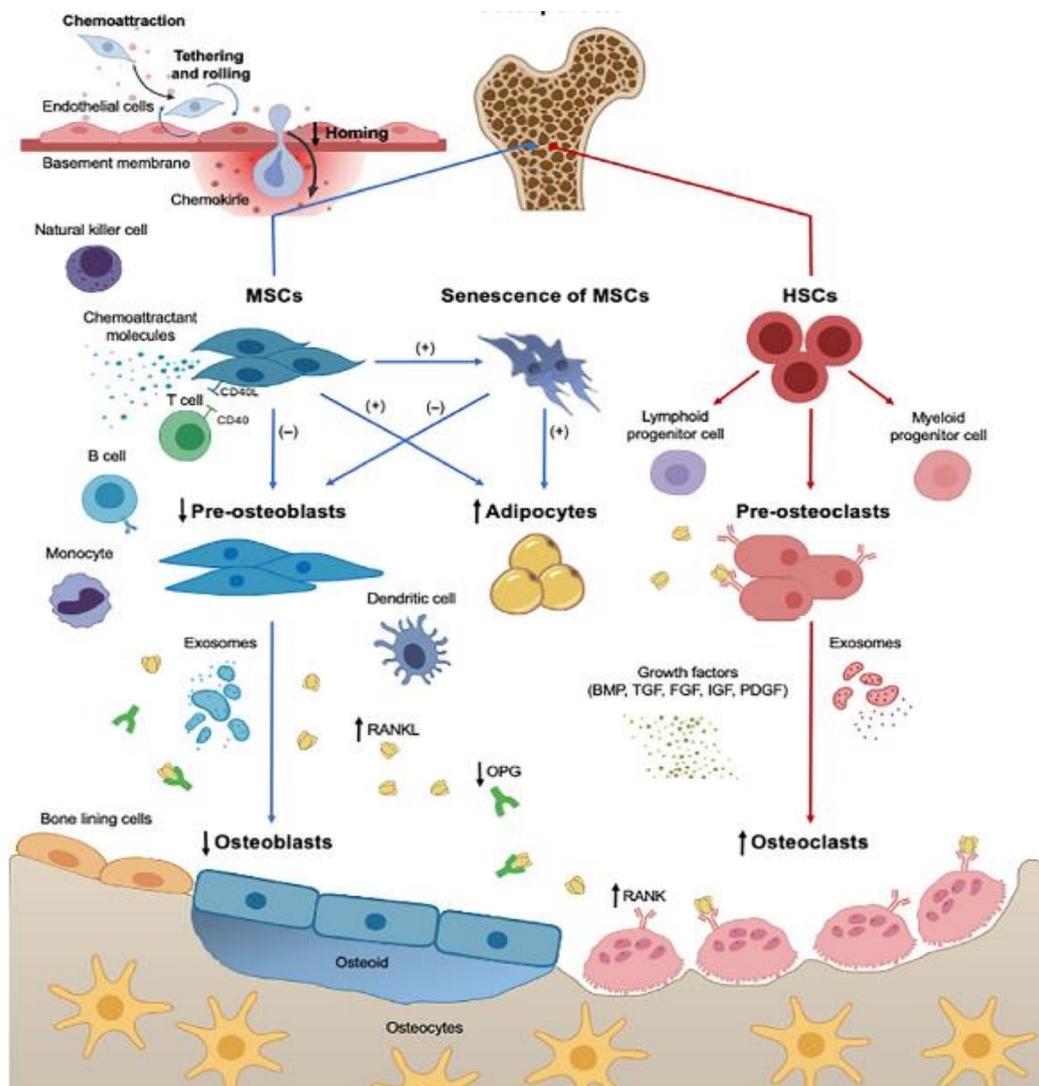


Figura 11: MSCs en la patogénesis de la OP. El trastorno de homing da como resultado la disminución del número de MSCs en el tejido óseo. La capacidad osteogénica disminuida y la adipogénica aumentada conduce a la existencia de osteoblastos menos maduros y más adipocitos. La senescencia de las MSCs agrava aun mas el desequilibrio de osteoblastos y adipocitos. Además la activación anómala de las célula inmunitarias y la capacidad inmunoreguladora alterada de las MSCs provocan trastornos en el hueso. Imagen obtenida de: Jiang Y, Zhang P, Zhang X, Lv L, Zhou Y. *Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis*. Cell Prolif. 2021 Jan;54(1)

Vamos a ver en detalle los estudios llevados a cabo con los dos tipos de MSCs mencionadas anteriormente y otras menos utilizadas como son las MSCs de pulpa dental o de tejido amigdalario.

- MSCs de Médula Ósea (BM-MSCs)

El uso de BM-MSCs en ratas(129–131), y conejos(132) OVX como modelos para estudiar la OP, ha sido investigado en varios estudios. Se observó en la mayoría de ellos que la densidad ósea aumentaba significativamente, lo que indica que la destrucción y pérdida ósea se podría revertir. Se observó que, tras la inyección de BM-MSCs, el volumen y espesor trabecular y el porcentaje de área trabecular estaban aumentados. Esto indica que la degeneración microestructural podría aliviarse hasta cierto punto. Los niveles de marcadores osteogénicos en suero como el calcio, la fosfatasa alcalina o la osteocalcina, también aumentaron después de la inyección de MSCs.

Kiernan y cols.(131) desarrollaron un modelo de OP relacionada con la edad en ratones silenciando el gen *Sca-1*. Este modelo se encuadra dentro de un grupo de investigaciones que sugieren que el declive de las BM-MSCs por la edad es uno de los factores más importantes en la progresión de la OP(133). Los ratones *Sca1*-null demuestran una deficiencia celular autónoma en la capacidad de las BM-MSCs para apoyar la formación ósea, lo que facilita un estado de bajo recambio óseo con pérdida progresiva de hueso y debilidad mecánica a los 6 meses. Este modelo animal se considera un modelo de OP tipo 2(134,135). Estos investigadores inyectaron sistémicamente BM-MSCs alogénicas. Primero comprobaron la capacidad de las células en permanecer en la MO a largo plazo. También demostraron que se producía una mayor conectividad trabecular, lo que sugiere que un solo bolo de BM-MSCs es suficiente para mitigar el desarrollo de fenotipos osteopénicos y osteoporóticos durante al menos 24 semanas. Por lo tanto, el trasplante de BM-MSCs es una posible estrategia para prevenir o tratar tanto la OP por deficiencia de estrógenos como por la edad.

- MSCs de Tejido Adiposo (AD-MSCs)

Las AD-MSCs autólogas han sido reportadas como efectivas en el tratamiento de la OP en animales. Esta eficacia se resume en 3 resultados generales: 1) aumento del grosor cortical, de la densidad del volumen óseo y la carga ósea, 2) la mejora de la microestructura trabecular y 3) el aumento de marcadores como el calcio y la osteocalcina en sangre. Varias investigaciones estudian el uso de AD-MSCs para el tratamiento de OP:

Uri y cols.(136) utilizan un modelo de OP en ratas OVX. Se aportaron AD-MSCs autólogas sembradas en *scaffolds* de ácido hialurónico en el fémur distal en la cavidad intramedular. Este experimento demuestra que el grosor cortical medio, la densidad del volumen óseo total y la carga ósea fue significativamente más alto que en aquellas a las que se les inyectó las células sin andamios. El examen histológico del grupo tratado con AD-MSCs+Scaffold reveló una osteointegración completa de los andamios y la conversión de las AD-MSCs en osteoblastos sin generar ningún tipo de respuesta inflamatoria.

Por otro lado, Pan y cols.(137) utilizan el mismo tipo de MSCs pero en este caso alogénicas y en ratones. En este experimento descubren que las BM-MSCs de ratones con OP por OVX pierden su capacidad anti-inflamatoria y fallan en la prevención de pérdida ósea cuando se trasplantan de nuevo. Sin embargo, las AD-MSCs del mismo tipo de ratones, preservan su capacidad antiinflamatoria a pesar del microambiente desregularizado de los donantes y continúan demostrando efecto protector ante la OP en ratones OVX.

- MSCs de Pulpa dental (DP-MSCs)

Las DP-MSCs se reportaron en un experimento como células con mayor capacidad osteogénica que las BM-MSCs y con menor potencial adipogénico que éstas(138).

Kong y cols.(139) evaluaron el uso de este tipo de células en un modelo murino OVX. Tras la inyección de DP-MSCs humanas por vía intravenosa en ratones se comprobó que las DP-MSCs pueden sobrevivir más de 1 mes *in vivo*. Su eficacia a la hora de acudir al lugar de lesión (*homming*) es mayor cuando se trasplantan en un periodo temprano tras OVX. Tras la administración, se distribuyeron primero en el pulmón, luego en el hígado, sin embargo, apenas se distribuyeron en el hueso. Esto se traduce en que la acción de las DP-MSCs en el hueso se produjo mediante mecanismos paracrinos. Estos efectos consistieron en una reducción de la pérdida ósea trabecular de las metafisis del fémur distal. Los investigadores sugieren que la infusión sistémica puede ser un tratamiento potencial para la OP tipo I.

- MSCs de Tejido amigdalario (T-MSCs)

Las T-MSCs aisladas de las amígdalas, tienen potencial de diferenciarse no solo en el linaje mesodérmico, sino en los linajes endodérmico y ectodérmico, extendiendo su uso potencial e identificándose como una nueva opción terapéutica.

Los resultados del estudio de Kim y cols.(140) muestran que una doble inyección de T-MSCs directamente en la tibia proximal, resulta en la recuperación de la OP en un modelo murino de OP. La inyección doble se comparó con una sola inyección, y los resultados de imagen mediante micro-CT mostraron mejores resultados en la doble inyección. El efecto osteogénico cualitativo y cuantitativo fue más pronunciado en el grupo de inyección doble. La doble inyección mostró una recuperación sérica de los niveles de OCN, que patológicamente se encontraban altos en los ratones, además se observó un aumento de la fosfatasa alcalina, que es un marcador de formación ósea. En general, la inyección fue bien tolerada y no causó ningún tipo de toxicidad.

La expansión de Marrow Adipose Tissue (MAT) es un tipo de depósito de grasa en la MO. Se encuentra en el envejecimiento, anorexia nerviosa y diabetes. Se ha sugerido que la acumulación de MAT se establezca como un nuevo biomarcador para la evaluación del riesgo de OP(141). Pino y cols.(142) encontraron en pacientes con OP que la diferenciación osteogénica estaba debilitada mientras que la adipogénica estaba fortalecida, produciendo un declive en la formación ósea y fomentando la acumulación de MAT. Con el objetivo de revertir esta tendencia, se busca un nuevo enfoque que permite el trasplante de MSCs con una capacidad osteogénica superior para poder prevenir la OP. Con este objetivo, Kim y cols.(143) inyectaron T-MSCs humanas, pero en

este caso por inyección intravenosa. Los resultados demostraron una atenuación parcial de la progresión de la enfermedad en ratas con OP relacionada con la edad. En el grupo tratado con T-MSCs se demostró que puede atenuar la progresión de OP senil manteniendo los niveles de osteocalcina en la circulación, y mostrando una microarquitectura mejorada. También se descubrió una reducción de la adiposidad de la MO después de la inyección. Este papel dual de las T-MSCs aumentando la mineralización ósea y reduciendo la adiposidad de la MO sugiere que puede ser una nueva fuente terapéutica posible para el tratamiento de OP relacionada con la edad.

El rendimiento y la inmunogenicidad de cada tipo de fuente de MSC es diferente, cada una tiene sus ventajas y desventajas. Todavía existe controversia en torno a sobre qué tejido se debe obtener las células. La falta de estandarización del tipo de administración es un problema aún sin resolver. Agata y cols.(144) compararon la seguridad y eficacia de la administración intravenosa e intramedular de MSC para tratar la OP inducida por OVX. Con referencia a la mortalidad, ningún ratón que recibió la inyección intramedular murió mientras que el 22% de los que recibieron la intravenosa, murieron. Evaluando la eficacia, en aquellos que recibieron administración intramedular, la BMD mejoró mediante el aumento tanto de la mineralización como del grosor del hueso, mientras que la administración intravenosa sí que mejoró la mineralización, pero no el grosor.

- **MSCs modificadas genéticamente**

La modificación genética de genes osteogénicos y angiogénicos en las MSCs es una vía para lograr mejorar sus capacidades osteogénicas, a fin de conseguir una mayor efectividad en los tratamientos basados en estos tipos de células. Esta mejora se puede conseguir usando diferentes aproximaciones.

- Sobreexpresión de genes relacionados con osteogénesis como BMP2, BMP6, RUNX2 y OSX. La transducción del gen BMP-2 puede restaurar el potencial osteogénico de las MSCs. Yang y cols.(145) estudian la sobreexpresión de BMP2 en MSCs alogénicas de tejido adiposo en ratas con OP inducida por OVX. Tras 12 semanas de la inyección intravenosa de estas MSCs modificadas genéticamente, se observó que histológicamente, este grupo de ratas tenían trabéculas más completas, y menos espaciadas que el grupo control que solo había recibido BMP2, o MSCs alogénicas de tejido adiposo, o que no recibieron nada.
- Sobreexpresión de genes angiogénicos como el factor codificante de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF 2) y la subunidad B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFB), para favorecer la angiogénesis. Chen y cols.(146) usaron MSCs modificadas genéticamente para que sobreexpresaran PDGFB. Los resultados fueron un aumento de la formación ósea trabecular, la conectividad trabecular, disminución de la porosidad cortical y aumento de la fuerza del hueso en un 45%.
- Modificación de los genes relacionado con el *homing* como CXCR4. CXCR4 es un receptor específico para CXCL12. Es un factor de señalización importante en el *homing* de las MSCs. Shangani y cols.(147) recolectaron BM-MSC alogénicas de ratas jóvenes y ovariectomizadas. Se les transfirió cDNA de CXCR4 y se administraron IV. A las 12 semanas de la inyección, los resultados de la micro CT y la evaluación mecánica revelaron que aquellas ratas tratadas con las MSCs

modificadas genéticamente mostraron un densidad ósea significativamente mayor que aquellas de los grupos controles que solo recibieron MSCs sin transferencia de DNA o aquellas que recibieron suero salino.

- **Nuevas perspectivas en OP: Vesículas extracelulares**

Recientemente las investigaciones sobre MSCs en OP se han centrado en las vesículas extracelulares (EVs) secretadas por las MSCs. Las EVs juegan un papel importante en la comunicación célula-célula. Son vesículas cargadas de partículas bioactivas que se liberan al espacio extracelular. A diferencia de la inyección de MSCs, las EVs interactúan con sus objetivos a través de la transducción de señales al acoplarse en la membrana plasmática de la célula objetivo y/o liberando la carga bioactiva que contiene tras la fusión o endocitosis seguida de la fusión con la membrana del compartimento endosómico en el microambiente de la remodelación ósea(148,149). Además de inhibir la respuesta inflamatoria y promover la vascularización que son efectos similares al trasplante de MSCs, las EVs promueven la formación ósea mediante la reparación de la actividad de las MSCs endógenas y mejorar la función osteoblástica.

Apenas existen investigaciones sobre el uso de EVs en modelos de OP en animales. Sí que hay estudios sobre su acción en regeneración ósea *in vivo*, pero son en modelos de otras enfermedades o condiciones. Qi y cols.(150) estudiaron en ratas con un defecto crítico óseo y Liu y cols.(151) en ratones tras recibir radiación que les produjera pérdida ósea. En ambos estudios se observó que las EVs derivadas de BM-MSCs redujeron la pérdida ósea, aumentaron la mineralización ósea y estimularon la regeneración ósea de manera similar que la inyección de las propias MSCs.

Aun así, los resultados de experimentos *in vitro* arrojan esperanza en esta nueva terapia en comparación con el trasplante de MSCs. Presentan alta seguridad, ya que no expresan proteínas MHC que causen rechazo inmunológico. Son más cómodas de almacenar, ya que se pueden mantener a -20° C durante mucho tiempo. Son estables, la membrana lipídica evita que las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes sean descompuestos por fluidos corporales(128). Aunque las EVs podrían evitar muchos problemas con la inyección de las MSC, representan en este momento una tendencia futura de tratamiento de la OP ya que la investigación en este campo aún se encuentra en su etapa inicial.

5. ACTUALIZACIÓN SOBRE LOS USOS CLÍNICOS DE LA TERAPIA CELULAR EN REGENERACIÓN ÓSEA

Los modelos animales son necesarios en la investigación del uso de MSCs ya que hay muy pocas investigaciones en humanos que nos permitan conocer más sobre los resultados de esta alternativa terapéutica. En este momento se encuentran registrados en *ClinicalTrials.gov* 392 ensayos clínicos completados y/o activos sobre terapia celular. De ellos, 36 son sobre la aplicación de MSCs en patología ósea. Los ensayos clínicos aplicados a las enfermedades analizados en este trabajo que están en fase de investigación son:

- Existen 2 ensayos clínicos en relación con la OP. Uno, realizado en *Cipto Mangunkusumo Hospital*, evalúa la densidad ósea tras los 6 meses de la implantación de MSCs alogénicas procedentes de cordón umbilical. Ahora mismo en fase de reclutamiento. El otro, desarrollado por el instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca, consiste en la infusión de BM-MSC autólogas en 10 pacientes con OP. Se encuentra en fase I, sin resultados publicados.
- En pseudoartrosis sólo existe 1 ensayo clínico desarrollado por laboratorios Salvat. Estudia el uso de AD-MSCs autólogas combinadas con un *scaffold* de fosfato tricálcico en el tratamiento quirúrgico de pseudoartrosis en huesos largos. Se incluyeron 12 pacientes. Su objetivo es evaluar su seguridad mediante el estudio de posibles efectos adversos y la efectividad mediante métodos radiológicos. Se encuentra en fase II.
- La ONCF cuenta con 4 ensayos clínicos completados y/o activos.
 - 1) Estudio dirigido por el Hospital Vall d'Hebron. Estudia la efectividad de XCEL-MT-OSTEO-ALPHA, un producto de ingeniería tisular formado por BM-MSCs autólogas expandidas *ex vivo* y fijadas en tejido óseo alogénico.
 - 2) Estudio realizado por el Hospital Universitario de Salamanca, con solo 3 participantes. Evalúa una suspensión de BM-MSCs autólogas expandidas *in vitro* en un medio específico enriquecido con lisado de plaquetas. Se implantan mediante una inyección intraósea en la cabeza femoral. Se encuentra en fase 2.
 - 3) Estudio llevado a cabo por la Universidad de Erasme. Evalúan la combinación de BM-MSCs autólogas junto a DC. Analizan, en un marco temporal de 24 a 60 meses tras el tratamiento, la reducción del dolor, la recuperación de la funcionalidad así como la reducción de necesidad de cirugía de artroplastia de cadera.
 - 4) Dirigido por R-Bio. Estudia el trasplante autólogo de AD-MSCs mediante inyección intraósea en la cabeza femoral.

Existen varios metaanálisis sobre la combinación de BM-MSCs autólogas con DC. Jeyaraman y cols.(60) han realizado una revisión sistemática de 6 metaanálisis. Esta revisión es la más actual acerca de este tratamiento en humanos. Estos investigadores dan una recomendación nivel II a esta terapia frente al uso de solo la DC ya que esta terapia ofrece mejor alivio del dolor, mejoría funcional significativa y retrasa el colapso de la cabeza femoral.

6. CONCLUSIONES

- Todavía no se cuenta con tratamientos efectivos para enfermedades del sistema músculo esquelético como osteoporosis, pseudoartrosis, y necrosis de la cabeza femoral.
- La medicina regenerativa es la línea de investigación más prometedora en el diseño de tratamientos que consigan regenerar el tejido óseo, necesario para el tratamiento de estas enfermedades.
- El uso de Células Madre Mesenquimales ha sido ensayado en tratamientos para la necrosis de cabeza femoral, osteoporosis y pseudoartrosis. De momento, los estudios con los que contamos están realizados en animales de experimentación.
- A la hora de diseñar un modelo experimental para evaluar la reparación ósea mediante el uso de células madre mesenquimales, hay que tener en cuenta factores como la vía de administración, uso o no de *scaffolds*, uso de células alogénicas, uso de células modificadas genéticamente y la asociación de las células madre mesenquimales con otros tratamientos en el mismo animal.
- En el caso de la osteonecrosis de cabeza femoral, la oveja es el modelo animal más recomendable ya que los vectores de carga de los cuartos traseros son muy similares a las extremidades inferiores humanas.
- Para el estudio de las pseudoartrosis, no contamos con un modelo de animal de experimentación cuyas características sean superiores a otros. Se utilizan sobre todo roedores, por el bajo coste de estabulación, vida media corta y facilidad para acceder a muchos ejemplares en periodos cortos de tiempo.
- Para simular la osteoporosis, el modelo experimental más empleado es, sin lugar a duda, la rata. La osteoporosis se logra sometiendo al animal a una ovariectomía.
- Se han publicado múltiples estudios en modelos animales de estas tres enfermedades en los que se han utilizado células madre mesenquimales. La osteoporosis es la patología en la que se cuenta con menos experiencia en este campo.
- El uso del secretoma de las células madre mesenquimales ha abierto una nueva línea de investigación muy relevante ya que parece que se lograrían los mismos efectos regeneradores de tejido óseo utilizando una terapia libre de células.
- Los resultados de la mayoría de los ensayos analizados en este trabajo son muy positivos, pero se necesita todavía avanzar mucho en la investigación antes de trasladar estos resultados a la clínica.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Flor y Ana, directoras de este trabajo, por su atención durante todo el curso, su interés, su disponibilidad y sobre todo por su paciencia durante la realización de este trabajo.

A mis padres y mi hermana, por ser mi apoyo incondicional. Por creer siempre en mí.

A mi familia en esta ciudad. Inés y Marina. Por hacer de un piso de estudiantes, un hogar.

A todos los amigos que me ha brindado esta carrera, porque siempre han formado, forman y formarán parte de mi vida.

A todos, gracias.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AD-MSC: Células madre mesenquimales obtenidas del tejido adiposo

BCP: Fosfato bicálcico

BM-MSC : Células madre mesenquimales obtenidas de la médula osea

BMP: Proteínas Morfogénicas del hueso

BMP2: Proteína morfogénica ósea 2

BMP6: Proteína morfogénica ósea 6

BMP7: Proteína morfogénica ósea 7

CaP: Fosfatos de calcio

CB-MSC: Células madre mesenquimales obtenidas del hueso cortical

CME: células madre embrionarias

CME: Células madre embrionarias

CMPI: Células madre pluripotenciales inducidas

Col1A1: Cadena de colágeno tipo 1 alfa

DC: Descompresión central

dECM: Matriz ósea extracelular descelularizada

E11: Podoplanina

ECD: Dosis celular eficaz

ECM: Matriz ósea extracelular

Esr1: Receptor alfa estrogénico

FDA: *Food and Drug Administration – Administración de Medicamentos y Alimentos (Estados Unidos)*

FGF-2: Factor de crecimiento de fibroblastos 2

GC: Glucocorticoides

GFP: Green Fluorescent Protein – Proteína verde Fluorescente

HA: Hidroxiapatita

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico - 1

IL: Interleucina

IL10: Interleucina 10

IL6: Interleucina 6

LPS: Liposacáridos

LRP5: Receptor de lipoproteínas de baja densidad 5

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

MHC-I: Complejo mayor de histocompatibilidad clase I

MHC-II: Complejo mayor de histocompatibilidad clase II

MO: Médula Ósea

MSC: *Mesenchymal stem cell* – Célula madre mesenquimal

NFATc1: Factor Nuclear de células T activadas 1

NIH: *National Institutional of Health* – Instituto Nacional de Salud (Estados Unidos)

NUSS: *Non-Union Score System*

OC: Osteocalcina

OPG: Osteoprotegerina

OPN: Osteopontina

OVX: Ovariectomía

PDGFB: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGA: *Polyglycolic acid* – Ácido Poliglicólico

PGE2: Prostaglandina E2

PLA: Ácido Poliláctico

PLGA: *Poly lactic-co-glycolic acid* – Ácido poliglicoláctico

PTH 1-34: Paratohormona 1-34

PTH: Paratohormona

RANK-L Ligando de Receptor Activador para el Factor Nuclear κ B

RANKL-R: Receptor activador del factor nuclear kappa-B

RANKreceptor activador del factor nuclear kappa-B (

RFP: Red Fluorescent Protein

rhBMPs: BMP humano recombinante

SCCP: Polifosfato de calcio combinado con estroncio

TFG- β : factor de crecimiento transformador-beta

T-MSC: *Tonsil derived mesenchymal stem cell* – Célula Madre Mesenquimal de tejido amigdalal

TNF α factor de necrosis tumoral alfa

Wnt: proteínas Wingless

BIBLIOGRAFÍA

1. Levasseur R. Fisiología del tejido óseo. EMC - Apar Locomot. 2019;52(2):1–25. A
2. Carpintero Benítez P. Fisiopatología ósea. In: Traumatología y ortopedia Generalidades. 1st ed. Elsevier Es; 2020. p. 101–9.
3. Schett G. Biología , fisiología y morfología del hueso. En: Kelley y Firestein. Tratado de reumatología. Tenth Edit. Elsevier Esp; 2020. p. 60–5.
4. Manolagas SC. Normal skeletal development and regulation of bone formation and resorption - UpToDate [Internet]. 2020 [Consultado 30 Dec 2020]. p. 1–42. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/normal-skeletal-development-and-regulation-of-bone-formation-and-resorption>
5. Bonewald LF. The amazing osteocyte. J Bone Miner Res. 2011;26(2):229–38.
6. Matic I, Matthews BG, Wang X, Dymont NA, Worthley DL, Rowe DW, et al. Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. Stem Cells. 2016;34(12):2930–42.
7. Lamana Domínguez A, Rodríguez de Gortázar A, Martín Millán MM, Santos Sanz S. Bases de biología celular y molecular en cirugía ortopédica y traumatología. En: Gómez Barrena E, editor. Traumatología y Ortopedia Generalidades. 1st ed. Elsevier; 2020. p. 64–85.
8. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell. 2002;108(1):17–29.
9. Shu B, Zhang M, Xie R, Wang M, Jin H, Hou W, et al. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. J Cell Sci. 2011;124(20):3428–40.
10. Shen B, Wei A, Whittaker S, Williams LA, Tao H, Ma DDF, et al. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. J Cell Biochem. 2010;109(2):406–16.
11. Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, MacDougald OA. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein α and peroxisome proliferator-activated receptor γ . J Biol Chem. 2007;282(19):14515–24.
12. Dallas SL, Bonewald LF. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. In: Annals of the New York Academy of Sciences. Blackwell Publishing Inc.; 2010. p. 437–43.
13. Riancho JA, Delgado-Calle J. Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. Reumatol Clin. 2011;7(S2):1–4.
14. Ben-awadh AN, Delgado-Calle J, Tu X, Kuhlenschmidt K, Allen MR, Plotkin LI, et al. Parathyroid hormone receptor signaling induces bone resorption in the adult

- skeleton by directly regulating the RANKL gene in osteocytes. *Endocrinology*. 2014;155(8):2797–809.
15. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, et al. Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction. *Cell Metab*. 2007;5(6):464–75.
 16. Brusco AB, Lopez Costa JJ, Fabian Loidl C. *Histología médico-práctica*. En: *Histología médico-práctica*. Barcelona: Elsevier Es; 2014. p. 133–51.
 17. Hu MS, Walmsley GG, Lorenz HP, Longaker MT. *Medicina regenerativa*. En: *Sabiston Tratado de cirugía*. 20th Editi. Elsevier España S.L.U.; 2018. p. 163–72.
 18. Friedenstein AJ, Gorskaja UF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* [Internet]. 1976 [Consultado 3 May 2021];4(5):267–74. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/976387/>
 19. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. Vol. 35, *Bioscience Reports*. 2015. p. 1–18.
 20. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(17):3323–48.
 21. Samsonraj RM, Rai B, Sathiyathan P, Puan KJ, Röttschke O, Hui JH, et al. Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency. *Stem Cells* [Internet]. 2015 Jun 1 [Consultado 1 Jan 2021];33(6):1878–91. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25752682/>
 22. Zhou W, Xu Y. Application of mesenchymal stem cells in human diseases. En: El-Hashash AH., editor. *Mesenchymal Stem Cells in Human Health and Diseases*. Elsevier Inc.; 2020. p. 5–15.
 23. Bhartiya D. The need to revisit the definition of mesenchymal and adult stem cells based on their functional attributes. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):4–6.
 24. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Transl Med*. 2017 Jun 1;6(6):1445–51.
 25. Domínguez LM, Fiore EJ, Mazzolini GD. Células madre/estromales mesenquimales. Su potencial terapeutico en medicina. *Med (Buenos aires)* [Internet]. 2020;80:696–702.
 26. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*. 2019;8(8):886.
 27. Yousefi AM, James PF, Akbarzadeh R, Subramanian A, Flavin C, Oudadesse H. Prospect of stem cells in bone tissue engineering: A review. *Stem Cells Int*. 2016;2016:13.
 28. Asatrian G, Pham D, Hardy winters R, James A, Peault B. Stem cell technology for bone regeneration: current status and potencial applications. *Stem Cells Cloning Adv Appl*. 2015;8:39–48.

29. Iaquinta MR, Mazzoni E, Bononi I, Rotondo JC, Mazziotta C, Montesi M, et al. Adult Stem Cells for Bone Regeneration and Repair. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7(November):1–15.
30. Anastasio A, Gergues M, Lebhar MS, Rameshwar P, Fernandez-Moure J. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells in orthopaedics and the emergence of compact bone mesenchymal stem cells as a promising surgical adjunct. *World J Stem Cells.* 12(11):1341–53.
31. Lin H, Sohn J, Shen H, Langhans MT, Tuan RS. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. Vol. 203, *Biomaterials.* 2019. p. 96–110.
32. O'Connor AJ, Marre D, Yap KK, Heath DE, Morrison WA. Tissue engineering. En: Elsevier Health Sciences, editor. *Plastic Surgery.* Fourth Edi. Elsevier Inc.; 2017. p. 231-260.e8.
33. Oryan A, Kamali A, Moshirib A, Eslaminejad MB. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs.* 2017;204(2):59–83.
34. Barba M, Cicione C, Bernardini C, Michetti F, Lattanzi W. Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: State of the art. *Biomed Res Int.* 2013;2013.
35. Malhotra A, van Blitterswijk C, Habibovic P. Engineering Niches for Bone Tissue Regeneration. In: Vishwakarma A, Karp JM, editors. *Biology and Engineering of Stem Cell Niches.* Elsevier Inc.; 2017. p. 499–516.
36. Perez JR, Kouroupis D, Li DJ, Best TM, Kaplan L, Correa D. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;6(July):1–23.
37. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42(6):551–5.
38. Aiyer A. Fracture healing [Internet]. 2020 [Consultado 3 Jan 2021]. Disponible en: <https://www.orthobullets.com/basic-science/9009/fracture-healing>
39. Megías M, Molist P, Pombal M. Tejidos animales. Atlas de histología vegetal y animal [Internet]. [Consultado 3 Jan 2021]. Disponible en: https://mmegias.webs.uvigo.es/guaida_a_oseo.php
40. Freitas J, Santos SG, Gonçalves RM, Teixeira JH, Barbosa MA, Almeida MI. Genetically engineered-MSC therapies for non-unions, delayed unions and critical-size bone defects. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14).
41. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* [Internet]. 2010 Jan [Consultado 9 Abr 2021];31(3):461–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19819008/>
42. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* [Internet]. 2005 [Consultado 9 Abr 2021];26(27):5474–91.

Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15860204/>

43. Sun H, Yang HL. Calcium phosphate scaffolds combined with bone morphogenetic proteins or mesenchymal stem cells in bone tissue engineering. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(8):1121–7.
44. Gao C, Peng S, Feng P, Shuai C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Research*. 2017;5:1–33.
45. De Witte TM, Fratila-Apachitei LE, Zadpoor AA, Peppas NA. Bone tissue engineering via growth factor delivery: From scaffolds to complex matrices. *Regen Biomater*. 2018;5(4):197–211.
46. Martin - Piedra AM-PL. Matrices para Ingeniería del tejido óseo. *Actual Medica*. 2019;104(806):36–45.
47. Lee EJ, Kasper FK, Mikos AG. Biomaterials for tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*; 2014;42(2):323–37.
48. Kim YS, Majid M, Melchiorri AJ, Mikos AG. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering. *Bioeng Transl Med*. 2019;4(1):83–95.
49. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363–408.
50. Cahill KS, McCormick PC, Levi AD. A comprehensive assessment of the risk of bone morphogenetic protein use in spinal fusion surgery and postoperative cancer diagnosis. *J Neurosurg Spine*. 2015;23(1):86–93.
51. Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, Lynch S, Friedlaender GE. Recombinant human platelet-derived growth factor: Biology and clinical applications. *J Bone Jt Surg*. 2008;90(S1):48–54.
52. Grayson WL, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Vunjak-Novakovic G. Bioreactor cultivation of functional bone grafts. *Methods Mol Biol*. 2011;698:231–41.
53. Ladewig K, O’connor AJ, Abberton K, O’connor AJ. Designing In Vivo Bioreactors for Soft Tissue Engineering Advanced Materials and Architectures through Cyclodextrin Host-Guest Chemistry View project Fluorescent nanoparticles for bioimaging applications View project Designing In Vivo Bioreactors for Soft Tissue Engineering. *Artic J Biomater Tissue Eng*. 2012;2:1–13.
54. Hinsenkamp M, Muylle L, Eastlund T, Fehily D, Noël L, Strong DM. Adverse reactions and events related to musculoskeletal allografts: Reviewed by the World Health Organisation Project NOTIFY. *Int Orthop*. 2012;36(3):633–41.
55. Chang C, Greenspan A, Beltran J, Gershwin ME. Osteonecrosis. En: Kelley y Firestein *Tratado de reumatología*. Tenth Edit. Elsevier Esp; 2020. p. 1764–87.
56. Guerado E, Caso E. The physiopathology of avascular necrosis of the femoral head: an update. *Injury*. 2016;47:s13-s26
57. Pouya F, Kerachian MA. Avascular necrosis of the femoral head: Are any genes

- involved? *Arch Bone Jt Surg*. 2015;3(3):149–55.
58. Barney J, Piuizzi NS, Akhondi H. Femoral Head Avascular Necrosis [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2021 [Consultado 7 Mar 2021]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31536264>
 59. Hartley WT, McAuley JP, Culpepper WJ, Engh J, Engh S. Osteonecrosis of the femoral head treated with cementless total hip arthroplasty. *J Bone Jt Surg - Ser A*. 2000;82(10):1408–13.
 60. Jeyaraman M, Muthu S, Jain R, Khanna M. Autologous bone marrow derived mesenchymal stem cell therapy for osteonecrosis of femoral head: A systematic overview of overlapping meta-analyses. *J Clin Orthop Trauma*. 2021;13:134–42.
 61. Wang Y, Ma X, Chai W, Tian J. Multiscale stem cell technologies for osteonecrosis of the femoral head. *Stem Cells Int*. 2019;2019.
 62. Toosi S, Behravan N, Behravan J. Nonunion fractures, mesenchymal stem cells and bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2018;106(9):2552–62.
 63. Calori G. Non-unions. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2017;14(2):186.
 64. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, et al. Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*. 2014;45(S2):3–7.
 65. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*. 2015;70:93101.
 66. Schlundt C, Bucher CH, Tsitsilonis S, Schell H, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Clinical and Research Approaches to Treat Non-union Fracture. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(2):155–68.
 67. Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2006 [Consultado 3 Abr 2021];88 Suppl 1 Pt 2:322–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16951103/>
 68. Mathieu M, Rigutto S, Ingels A, Spruyt D, Stricwant N-D, Kharroubi I, et al. Decreased pool of mesenchymal stem cells is associated with altered chemokines serum levels in atrophic nonunion fractures. *Bone*. 2013;53(2):391-398
 69. Calori GM, Phillips M, Jeetle S, Tagliabue L, Giannoudis P V. Classification of non-union: Need for a new scoring system? *Injury*. 2008;39:59-63.
 70. Abumunaser LA, Al-Sayyad MJ. Evaluation of the Calori et al nonunion scoring system in a retrospective case series. *Orthopedics*. 2011;34(5)359.
 71. Calori GM, Colombo M, Mazza EL, Mazzola S, Malagoli E, Marelli N, et al. Validation of the Non-Union Scoring System in 300 long bone non-unions. *Injury*. 2014;45(S6):S93–7.
 72. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone:

- Material and matrix considerations *Bone Joint Surg Am.* 2008;90(1):36–42.
73. Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Ortho Relat Res.* 2002;(405): 14–23.
 74. Singh S V., Tripathi A. An overview of osteoporosis for the practising prosthodontist. *Gerodontology.* 2010;27(4):308–14.
 75. Rossini M, Adami S, Bertoldo F, Diacinti D, Gatti D, Giannini S, et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of osteoporosis. *Reumatismo.* 2016;68(1):1–39.
 76. Siris ES, Adler R, Bilezikian J, Bolognese M, Dawson-Hughes B, Favus MJ, et al. The clinical diagnosis of osteoporosis: A position statement from the National Bone Health Alliance Working Group. *Osteoporos Int.* 2014;25(5):1439–43.
 77. Arboleya L, Casado E, Casta S, Fiter J, Gifre L, Vaquero CG, et al. Recomendaciones de la Sociedad Española de Reumatología sobre osteoporosis. *Reumatol clínica.* 2018;15(4):188–210.
 78. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J-Y. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2019;30:3–44.
 79. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: Medical management, epidemiology and economic burden: A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos.* 2013;8:1–2.
 80. Kanis JA, Borgström F, Compston J, Dreinhöfer K, Nolte E, Jonsson L, et al. SCOPE: A scorecard for osteoporosis in Europe. *Arch Osteoporos.* 2013;8:1-63.
 81. Liu L, Webster TJ. In Situ Sensor Advancements for Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Treatment. *Curr Osteoporos Rep.* 2016;14(6):386–95.
 82. Francois EL, Yaszemski MJ. Preclinical Bone Repair Models in Regenerative Medicine. 3^o. En: *Principles of Regenerative Medicine.* Elsevier Inc.; 2020. p.761–767.
 83. Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The Design and Use of Animal Models for Translational Research in Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B.* 2010;16(1):123–45.
 84. Pearce A, Richards R, Milz S, Scheider E, Pearce S. ANIMAL MODELS FOR IMPLANT BIOMATERIAL RESEARCH IN BONE : A REVIEW. *Eur Cells Med.* 2007;13:1–10.
 85. Fan M, Peng J, Qin L, Lu S. Experimental animal models of osteonecrosis. *Rheumatol Int.* 2011;31(8):983–94.
 86. Qin L, Zhang G, Sheng H, Yeung KW, Yeung HY, Chan CW, et al. Multiple bioimaging modalities in evaluation of an experimental osteonecrosis induced by a combination of lipopolysaccharide and methylprednisolone. *Bone.* 2006 Oct;39(4):863–71.

87. Kuroda Y, Akiyama H, Kawanabe K, Tabata Y, Nakamura T. Treatment of experimental osteonecrosis of the hip in adult rabbits with a single local injection of recombinant human FGF-2 microspheres. *J Bone Miner Metab.* 2010;28(6):608–16.
88. Conzemi MG, Brown TD, Zhang Y, Robinson RA. A new animal model of femoral head osteonecrosis: One that progresses to human-like mechanical failure. *J Orthop Res.* 2002;20(2):303–9.
89. Lopez Fernandez A. Tratamiento con células madre mesenquimales en un modelo experimental ovino de osteonecrosis de cabeza femoral. Doctor]. Universidad Autónoma de Barcelona; 2018
90. Li Z, Liao W. Intravenous transplantation of allogenic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *Int J Med Sci.* 2011;8(1):74–83.
91. Li Z, Liao W, Zhao Q, Liu M, Xia W, Yang Y, et al. Angiogenesis and bone regeneration by allogeneic mesenchymal stem cell intravenous transplantation in rabbit model of avascular necrotic femoral head. *J Surg Res.* 2013;183(1):193–203.
92. Ueda S, Shimasaki M, Ichiseki T, Ueda Y, Tsuchiya M, Kaneuji A, et al. Prevention of glucocorticoid-associated osteonecrosis by intravenous administration of mesenchymal stem cells in a rabbit model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2017;18(1):1–7.
93. Asada T, Kushida T, Umeda M, Matsuya H, Sasai K. Prevention of corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits by intra-bone marrow injection of autologous bone marrow cells. *Rheumatology.* 2008;47:591–6.
94. Makihara T, Yoshioka T, Sugaya H, Aoto K, Wada H, Uemura K, et al. Feasibility and Efficacy of Autologous Bone Marrow Aspirate Transplantation Combined with Human Parathyroid Hormone 1-34 Administration to Treat Osteonecrosis in a Rabbit Model. *Bone Marrow Res.* 2017;2017:1–8.
95. Matsuya H, Kushida T, Asada T, Umeda M, Wada T, Iida H. Regenerative effects of transplanting autologous mesenchymal stem cells on corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Mod Rheumatol.* 2008;18(2):132–9.
96. Song H, Tao L, Wang F, Wang W, Wei Y, Shen W, et al. Effect of bone mesenchymal stem cells transplantation on the micro-environment of early osteonecrosis of the femoral head. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(11):14528–34.
97. Yang J, Wang L, Xu Y, Wang J, Wang Y. An experimental study on treatment of steroid-associated femoral head necrosis with simvastatin and BMSCs transplantation. Vol. 22. 2008.
98. Kang P, Xie X, Tan Z, Yang J, Shen B, Zhou Z, et al. Repairing defect and preventing collapse of femoral head in a steroid-induced osteonecrotic of femoral head animal model using strontium-doped calcium polyphosphate combined BM-MNCs. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(2):1–9.

99. Yan Z, Hang D, Guo C, Chen Z. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to Osteonecrosis of femoral head. *J Orthop Res.* 2009;27(4):442–6.
100. Jin H, Xia B, Yu N, He B, Shen Y, Xiao L, et al. The effects of autologous bone marrow mesenchymal stem cell arterial perfusion on vascular repair and angiogenesis in osteonecrosis of the femoral head in dogs. *Int Orthop.* 2012;36(12):2589–96.
101. Peng J, Wen C, Wang A, Wang Y, Xu W, Zhao B, et al. Micro-CT-based bone ceramic scaffolding and its performance after seeding with mesenchymal stem cells for repair of load-bearing bone defect in canine femoral head. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2011;96 B(2):316–25.
102. Caminal M, Vélez R, Rabanal RM, Vivas D, Batlle-Morera L, Aguirre M, et al. A reproducible method for the isolation and expansion of ovine mesenchymal stromal cells from bone marrow for use in regenerative medicine preclinical studies. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11(12):3408–16.
103. Vélez R, Hernández-Fernández A, Caminal M, Vives J, Soldado F, Fernández A, et al. Treatment of femoral head osteonecrosis with advanced cell therapy in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2012;132(11):1611–8.
104. Levi M, Feitosa T, Li LF, Cristina P, Iii BB, Valverde C, et al. Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine. Sucesso no transplante de células tronco mesenquimais em ovinos com osteonecrose induzida da cabeça do fêmur . Resultados preliminares. *Acta Cir Bras.* 2010;25(5):416–22.
105. Poignard A, Lebouvier A, Cavet M, Rahmouni A, Flouzat Lachaniette CH, Bierling P, et al. New preclinical porcine model of femoral head osteonecrosis to test mesenchymal stromal cell efficiency in regenerative medicine. *Int Orthop.* 2014;38(9):1837–44.
106. Gangji V, Hauzeur J-P, Schoutens A, Hinsenkamp M, Appelboom T, Egrise D. Abnormalities in the replicative capacity of osteoblastic cells in the proximal femur of patients with osteonecrosis of the femoral head. *J Rheumatol.* 2003;30(2).
107. Mills LA, Simpson AHRW. In vivo models of bone repair. *J Bone Jt Surg - Ser B.* 2012;94 B(7):865–74.
108. Choi P, Ogilvie C, Thompson Z, Miclau T, Helms JA. Cellular and molecular characterization of a murine non-union model. *J Orthop Res.* 2004;22(5):1100–7.
109. Galhardo Franco G, Minto BW, Dreibi RM, Costa Junior JS, Dias LGGG. Percutaneous application of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell in dogs submitted to minimally invasive plate osteosynthesis of the tibia. *Acta Cir Bras.* 2021;36(2):e360206.
110. Tawonsawatruk T, West CC, Murray IR, Soo C, Peaúlt B, Simpson AHRW. Adipose derived pericytes rescue fractures from a failure of healing-non-union. *Sci Rep.* 2016;6(October 2015):1–7.

111. Jiang X, Xu C, Shi H, Cheng Q. PTH1-34 improves bone healing by promoting angiogenesis and facilitating MSCs migration and differentiation in a stabilized fracture mouse model. *PLoS One*. 2019;14(12):1–15.
112. Huang S, Xu L, Zhang Y, Sun Y, Li G. Systemic and local administration of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes fracture healing in rats. *Cell Transplant*. 2015;24(12):2643–55.
113. Zhu J, Liu Y, Chen C, Chen H, Huang J, Luo Y, et al. Cyasterone accelerates fracture healing by promoting MSCs migration and osteogenesis. *J Orthop Transl*. 2021;28:28–38.
114. Wang X, Wang C, Gou W, Xu X, Wang Y, Wang A, et al. The optimal time to inject bone mesenchymal stem cells for fracture healing in a murine model 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):1–10.
115. Desai P, Hasan SM, Zambrana L, Hegde V, Saleh A, Cohn MR, et al. Bone Mesenchymal Stem Cells with Growth Factors Successfully Treat Nonunions and Delayed Unions. *HSS J*. 2015;11(2):104–11.
116. Dozza B, Salamanna F, Baleani M, Giavaresi G, Parrilli A, Zani L, et al. Nonunion fracture healing: Evaluation of effectiveness of demineralized bone matrix and mesenchymal stem cells in a novel sheep bone nonunion model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(9):1972–85.
117. Xue D, Zhang W, Chen E, Gao X, Liu L, Ye C, et al. Local delivery of HMGB1 in gelatin sponge scaffolds combined with mesenchymal stem cell sheets to accelerate fracture healing. *Oncotarget*. 2017;8(26):42098–115.
118. Schemitsch EH. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *J Orthop Trauma*. 2017;31(10):S20–2.
119. Watanabe Y, Harada N, Sato K, Abe S, Yamanaka K, Matushita T. Stem cell therapy: Is there a future for reconstruction of large bone defects? *Injury*. 2016;47(S1):47–51.
120. Maiti SK, Shivakumar MU, Mohan D, Kumar N, Singh KP. Mesenchymal Stem Cells of Different Origin-Seeded Bioceramic Construct in Regeneration of Bone Defect in Rabbit. *Tissue Eng Regen Med*. 2018;15(4):477–92.
121. Prat S, Gallardo-Villares S, Vives M, Carreño A, Caminal M, Oliver-Vila I, et al. Clinical translation of a mesenchymal stromal cell-based therapy developed in a large animal model and two case studies of the treatment of atrophic pseudoarthrosis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(1):e532–40.
122. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2005;16:s129–38.
123. Komori T. Animal models for osteoporosis. *Eur J Pharmacol*. 2015;759:287–94.
124. Harvey EJ, Giannoudis P V., Martineau PA, Lansdowne JL, Dimitriou R, Moriarty TF, et al. Preclinical animal models in trauma research. *J Orthop Trauma*. 2011;25(8):488–93.

125. Almeida M, Iyer S, Martin-Millan M, Bartell SM, Han L, Ambrogini E, et al. Estrogen receptor- α signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual. *J Clin Invest*. 2013 Jan 2;123(1):394–404.
126. Määttä JA, Büki KG, Gu G, Alanne MH, Vääräniemi J, Liljenbäck H, et al. Inactivation of estrogen receptor α in bone-forming cells induces bone loss in female mice. *FASEB J*. 2013;27(2):478–88.
127. WHO. Guidelines for preclinical evaluation and clinical trials in osteoporosis [Internet]. 1998. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42088>
128. Jiang Y, Zhang P, Zhang X, Lv L, Zhou Y. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis. *Cell Prolif*. 2021;54(1):e12956.
129. Ocarino NDM, Boeloni JN, Jorgetti V, Gomes DA, Goes AM, Serakides R. Intra-bone marrow injection of mesenchymal stem cells improves the femur bone mass of osteoporotic female rats. *Connect Tissue Res*. 2010;51(6):426–33.
130. Yu Z, Zhu T, Li C, Shi X, Liu X, Yang X, et al. Improvement of intertrochanteric bone quality in osteoporotic female rats after injection of polylactic acid-polyglycolic acid copolymer/collagen type i microspheres combined with bone mesenchymal stem cells. *Int Orthop*. 2012;36(10):2163–71.
131. Kiernan J, Hu S, Grynypas MD, Davies JE, Stanford WL. Systemic Mesenchymal Stromal Cell Transplantation Prevents Functional Bone Loss in a Mouse Model of Age-Related Osteoporosis. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5:683–93.
132. Wang Z, Goh J, Das De S, Ge Z, Ouyang H, Chong JSW, et al. Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. *Tissue Eng*. 2006;12(7):1753–61.
133. Bellantuono I, Aldahmash A, Kassem M. Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2009 Apr 1;1792(4):364–70.
134. Holmes C, Khan TS, Owen C, Ciliberti N, Grynypas MD, Stanford WL. Longitudinal analysis of mesenchymal progenitors and bone quality in the stem cell antigen-1-null osteoporotic mouse. *J Bone Miner Res*. 2007;22(9):1373–86.
135. Bonyadi M, Waldman SD, Liu D, Aubin JE, Grynypas MD, Stanford WL. Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5840–5.
136. Uri O, Behrbalk E, Folman Y. Local implantation of autologous adipose-derived stem cells increases femoral strength and bone density in osteoporotic rats: A randomized controlled animal study. *J Orthop Surg*. 2018;26(3):1–7.
137. Pan Q, Li Y, Li Y, Wang H, Kong L, Yang Z, et al. Local administration of allogeneic or autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells enhances bone formation similarly in distraction osteogenesis. *Cytotherapy*. 2021;000:1–9.
138. Kumar A, Kumar V, Rattan V, Jha V, Bhattacharyya S. Secretome proteins regulate

- comparative osteogenic and adipogenic potential in bone marrow and dental stem cells. *Biochimie*. 2018;155:129–39.
139. Kong F, Shi X, Xiao F, Yang Y, Zhang X, Wang LS, et al. Transplantation of Hepatocyte Growth Factor-Modified Dental Pulp Stem Cells Prevents Bone Loss in the Early Phase of Ovariectomy-Induced Osteoporosis. *Hum Gene Ther*. 2018;29(2):271–82.
 140. KIM G, JIN YM, YU Y, KIM HY, JO SA, PARK YJ, et al. Double intratibial injection of human tonsil-derived mesenchymal stromal cells recovers postmenopausal osteoporotic bone mass. *Cytotherapy*. 2018;20(8):1013–27.
 141. Patsch JM, Li X, Baum T, Yap SP, Karampinos DC, Schwartz A V., et al. Bone marrow fat composition as a novel imaging biomarker in postmenopausal women with prevalent fragility fractures. *J Bone Miner Res*. 2013;28(8):1721–8.
 142. Pino AM, Rosen CJ, Pablo Rodríguez J. In Osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis. *Biol Res*. 2012;45(3):279–87.
 143. Kim YH, Park M, Cho KA, Kim BK, Ryu JH, Woo SY, et al. Tonsil-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Bone Mineralization and Reduce Marrow and Visceral Adiposity in a Mouse Model of Senile Osteoporosis. *Stem Cells Dev*. 2016;25(15):1161–71.
 144. Agata H, Sumita Y, Hidaka T, Iwatake M, Kagami H, Asahina I. Intra-Bone Marrow Administration of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Is a Promising Approach for Treating Osteoporosis. *Stem Cells Int*. 2019;2019:4214-81.
 145. Yang J, Zhao W, Wang N, Chen X, Li Z, Ma J, et al. Conditioned medium of adipose-derived mesenchymal stem cells combined with bone morphogenetic protein 2 effectively mitigates ovariectomy induced osteoporosis in rats. *Chinese J Tissue Eng Res*. 2020;24(1):7–13.
 146. Chen W, Baylink DJ, Brier-Jones J, Neises A, Kiroyan JB, Rundle CH, et al. PDGFB-based stem cell gene therapy increases bone strength in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(29):E3893–900.
 147. Sanghani A, Osagie-Clouard L, Samizadeh S, Coathup MJ, Kalia P, Di Silvio L, et al. CXCR4 Has the Potential to Enhance Bone Formation in Osteopenic Rats. *Tissue Eng Part A*. 2018;24(23–24):1775–83.
 148. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D’Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*. 2010;123:1603–11.
 149. Liang X, Ding Y, Zhang Y, Tse HF, Lian Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: Current status and perspectives. *Cell Transplant*. 2014;23(9):1045–59.
 150. Qi X, Zhang J, Yuan H, Xu Z, Li Q, Niu X, et al. Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells repair critical-sized bone defects through enhanced angiogenesis and osteogenesis in osteoporotic rats. *Int*

J Biol Sci. 2016;12(7):836–49.

151. Liu S, Liu D, Chen C, Hamamura K, Moshaverinia A, Yang R, et al. MSC transplantation improves osteopenia via epigenetic regulation of notch signaling in lupus. *Cell Metab.* 2015;22(4):606–18.