

# **UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y CIENCIAS DE LA  
SALUD



TESIS DOCTORAL

**Estudio de las células mesenquimales en la osteoporosis**

Realizada por: Laura López Delgado

Dirigida por: José Antonio Riancho Moral

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

Santander 2023





Facultad de Medicina

Departamento de Medicina y Psiquiatría

JOSE ANTONIO RIANCHO MORAL, Catedrático de Medicina de la Universidad de Cantabria, CERTIFICO:

Que Laura López Delgado ha llevado a cabo, bajo mi dirección, el trabajo de investigación titulado “Estudio de las células mesenquimales en la osteoporosis”.

Que este estudio reúne, a mi criterio, los méritos suficientes, en cuanto a originalidad, rigor científico y relevancia, para ser presentado como Tesis para obtener el grado de Doctor.

Santander a 7 de Diciembre de 2022.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'J. Riancho', is written over a horizontal blue line.



El desarrollo de esta tesis fue llevado a cabo fundamentalmente en el Departamento de Medicina y Psiquiatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria.

Esta investigación fue financiada mediante una beca del Instituto de Salud Carlos III (PI16/00915).



## **Agradecimientos**

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que me han acompañado en este camino.

En primer lugar, a mi directo y tutor de tesis, José Antonio Riancho Moral por su ejemplo, su inspiración, su apoyo y su paciencia.

Gracias a Javi por contagiarme la ilusión que me impulsó a empezar este proyecto, por su ayuda y su compañía.

Gracias a Maite por su cariño y por haberme cuidado siempre tanto.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio. Gracias a Jana y Alicia. Gracias a Carolina a Álvaro por su disponibilidad por alegrarme los días en la facultad.

Gracias a los miembros del servicio de Traumatología y Ortopedia que colaboraron en este trabajo, en especial a Maribel Pérez Núñez.

Gracias a mis Paulas, Alicia, Cristina, Nuria y Raúl. Gracias al resto de mis compañeros residentes y adjuntos del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Y gracias a mis nuevos compañeros de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Insular.

Gracias a Arancha a Marina por su amor incondicional. Gracias a todos los amigos que tengo la suerte de tener. Gracias a Stefano. Y, por último, gracias a mi familia por su cariño, por estar siempre a mi lado y por enseñarme a ser valiente. Gracias a mis abuelos, a mis primos y a mis tíos. Gracias a mis padres y a mi hermana a los que siempre he sentido cerca a pesar de la distancia.



## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>13</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>22</b>
El tejido óseo.....	24
Composición.....	24
Tipos celulares.....	25
Células mesenquimales.....	25
Osteoblastos.....	33
Osteocitos.....	34
Osteoclastos.....	35
Remodelado y modelado óseo.....	37
Consolidación de fracturas.....	39
Vías de consolidación.....	39
Alteraciones en la consolidación.....	41
Enfermedades óseas.....	43
Osteoporosis.....	43
Definición.....	43
Epidemiología.....	44
Etiología.....	46
Factores de riesgo.....	52
Tratamiento.....	53
Artrosis.....	61
Definición.....	61
Etiología y factores de riesgo.....	63
Epidemiología.....	63
Fisiopatología.....	63
Manifestaciones clínicas.....	64
Diagnóstico.....	64

Tratamiento.....	65
Epigenética.....	66
Envejecimiento y senescencia.....	68
Mecanismos bioquímicos implicados.....	68
Senescencia celular.....	70
Senescencia y osteoporosis.....	71
Células mesenquimales, envejecimiento y osteoporosis.....	71
Células mesenquimales y envejecimiento.....	71
Células mesenquimales y fármacos anabólicos.....	72
Aplicaciones terapéuticas de las células mesenquimales.....	72
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>76</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>81</b>
Partes del estudio.....	83
Obtención y cultivo de células mesenquimales.....	83
Formación ósea in vivo.....	85
Introducción de los implantes en el modelo animal.....	86
Procesamiento y estudio de los implantes.....	88
Inclusión, corte y tinción de los implantes.....	88
Retrotranscripción.....	90
PCR cuantitativa.....	91
Análisis de los resultados.....	91
Senescencia celular.....	92
Estudio de expresión de p16 y p21.....	92
Estudio de expresión de la actividad de beta-galactosidasa.....	93
Desarrollo de modelo de osteonecrosis mandibular .....	93
Extracción dental y administración de tratamientos.....	93
Inyección intraperitoneal.....	93
Inyección intravenosa.....	94
Extracción dental.....	94

Estudio radiológico.....	95
Análisis histológico.....	95
Aspectos éticos.....	95
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>97</b>
Estudio de la formación de hueso in vivo.....	99
Análisis histológico.....	99
Análisis en función de la existencia o no de MSCs .....	100
Análisis en función del origen de las MSCs.....	102
Análisis en función del sexo.....	104
Análisis en función de la edad.....	104
Análisis en función del tipo de partícula.....	106
Análisis según la localización del implante.....	107
Expresión de genes óseos.....	109
Estudio de senescencia.....	112
Estudio del modelo de osteonecrosis maxilar.....	114
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>118</b>
Osteoporosis y su tratamiento. Necesidad de aparición de nuevas terapias...	120
MSCs.....	122
Lugar de obtención de MSCs.....	122
Uso terapéutico de MSCs.....	123
Formación de hueso.....	124
Partículas.....	125
Senescencia.....	126
Osteonecrosis maxilar.....	127
Limitaciones del estudio.....	129
Aportaciones de esta tesis y perspectivas futuras.....	131
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>137</b>



## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ALPL	Fosfatasa alcalina
AP-1	Proteína activadora 1
APC	Poliposis adenomatosa del colon
ARN	Ácido ribonucleico
ASBMR	American society for bone and mineral research
b-cat	Beta catenina
BGLAP	Proteína ósea gamma-carboxiglutamato
BMP	Proteína morfogenética ósea
BSP	Sialoproteína ósea
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
CATK	Catepsina K
C/EBP $\alpha$	CCAT enhancer binding proteins
Cbfa1	Core binding $\alpha$ 1
CDD	Displasia cleidocraneal
cK	Caseína cinasa
Col1a1	Colágeno tipo I
CTX	Telopéptido c terminal del colágeno tipo 1
CXCR4 C-X-C	Motif chemokine receptor 4
DBM	Matriz ósea desmineralizada
DE	Desviación estándar
Dsh	Dishevelled
Dkk	Dickkopf
DMO	Densidad mineral ósea
DXA	Densitometría
EMA	Agencia europea de medicamentos

ESCs	Células madre embrionarias
FDA	US Food and Drug Administration
FFA	Fractura femoral atípica
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FGF23	Factor de crecimiento fibroblástico 23
FTVI	Enzima fucosiltransferasa VI
GSK3	Glucógeno sintasa cinasa 3b
GWAS	Genome wide association study
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histona deacetilasa
IBSP	Integrin binding sialoprotein
Ihh	Indian hedgehog protein
IL	Interleuquinas
lncARN	Ácido ribonucleico largo no codificante
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LRP	Co receptor relacionado con lipoproteína de baja densidad
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
microTC	Micro tomografía computarizada
miRNA	MicroRNA
MSCs	Células mesenquimales
MyoD	Myoblast determination protein 1
Myf5	Myogenic factor 5
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa beta
OC	Osteocalcina
OMS	Organización mundial de la salud
ONM	Osteonecrosis maxilar
OA	Artrosis
OP	Osteoporosis
OPG	Osteoprotegerina

OPN	Osteopontina
OSX	Osterix
P1NP	Propéptido amino/terminal del procolágeno tipo 1
PCR	Polimerase chain reaction
PTH	Paratohormona
PTHrp	Péptido relacionado con la paratohormona
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator activated receptor
RANK	Receptor activador para el factor nuclear $\kappa \beta$
RANKL	Ligando receptor activador para el factor nuclear $\kappa \beta$
RNAnc	Ácido ribonucleico no codificante
RUNX2	Runt related transcription factor 2
SASP	Senescence associated secretory pheontype
SDF-1	Stromal cell derived factor 1
SERMs	Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos
sFRP	Proteína soluble similar a frizzled
SNC	Sistema nervioso central
SOST	Esclerostina
SOX9	SRY-related high mobility group-box gene 9
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
TBS	Trabecular Bone Score
TCP	Fosfato tricálcico
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF-6	Factor asociado al receptor del TNF
TRAP	Tartrate resistant acid phosphatase
VSG	Velocidad de sedimentación glomerular



# Resumen



## RESUMEN

El hueso es un tejido que se encuentra en un constante proceso de remodelado debido a la acción de los osteoblastos, encargados de la formación ósea, y de los osteoclastos, encargados de su destrucción. La osteoporosis (OP) es la enfermedad metabólica ósea más prevalente y se produce por un desequilibrio entre la formación y la resorción del hueso existiendo un predominio en la resorción. La OP se caracteriza por una densidad mineral ósea (DMO) baja y por cambios en la microarquitectura del hueso que dan lugar a fragilidad ósea y a un aumento del riesgo de fractura. Las células mesenquimales (MSCs) son células pluripotenciales que conservan la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares incluyendo osteoblastos. En los últimos años, las MSCs han sido propuestas como candidatas para terapias celulares. No está esclarecido si las MSCs de pacientes con OP conservan su capacidad para la formación ósea in vivo y sería imprescindible esclarecerlo antes de plantear el empleo de estas células como una posible terapia en pacientes con OP. Por tanto, el objetivo de nuestro estudio era elucidar si las MSCs de pacientes con OP mostraban un fenotipo senescente, así como explorar su capacidad de formación ósea in vivo y la posibilidad de su empleo en el tratamiento de desórdenes esqueléticos como la ONM.

Obtuvimos MSCs de la cabeza femoral de pacientes con OP y de controles con artrosis (OA) durante cirugías de recambio de cadera. Las MSCs fueron implantadas en el tejido subcutáneo de ratones inmunodeprimidos y posteriormente se realizó un estudio histológico y de expresión de genes humanos mediante RT-PCR. En subcultivos de MSCs se realizó un estudio de expresión de genes asociados a fenotipo secretor de senescencia (SASP) así como de p16, p21 y galactosidasa. Por otro lado, intentamos desarrollar un modelo de osteonecrosis de mandíbula (ONM) inducida por bifosfonatos en ratones inmunodeprimidos para poder estudiar el posible efecto beneficioso de la administración sistémica de MSCs en este trastorno. Se extrajo el primer molar de los ratones y se le administró diferentes pautas de bifosfonato con/sin corticoides. Se realizó posteriormente un estudio radiológico e histológico para comprobar si se había producido ONM.

Se analizaron un total de 136 implantes subcutáneos obtenidos de 67 ratones diferentes. De estos implantes, 103 contenían MSCs; 47 de ellos correspondían a pacientes con OP y 56 a pacientes con OA. Globalmente, entre los implantes con MSCs, 47 (44,8%) presentaban algún grado de formación ósea, frente a solo 6 (18.1%) de los implantes sin MSCs ( $p=0,005$ ). De los implantes que contenían MSCs, se observó formación ósea en un 45% de los implantes con células de pacientes con OP y en un 46% de los implantes con células de pacientes con OA ( $p=0.859$ ). La expresión de genes característicos del linaje osteoblástico (colágeno, osteocalcina, fosfatasa alcalina y sialoproteína) fue similar en ambos grupos. Tampoco existieron diferencias en la expresión de los genes SASP, en la expresión de p16 ni p21 ni en la actividad de la galactosidasa asociada a la senescencia.

En cuanto al modelo de ONM, solo 1 de los 27 maxilares estudiados mostró hallazgos histológicos sugestivos de ONM.

Por tanto, nuestros resultados muestran que la capacidad de formación ósea in vivo de MSCs de pacientes con OP no fue inferior a la de controles con OA. Esto apoya el interés de estudios futuros para evaluar el beneficio potencial del uso de MSCs autólogas en pacientes con OP para procedimientos regenerativos. Con respecto al estudio de la ONM, a diferencia de los ratones inmunocompetentes, los ratones inmunodeficientes tienden a no desarrollar ONM incluso tras un insulto a la mucosa y a dosis altas de bifosfonatos. Podríamos especular que este hecho puede deberse a la propia inmunodeficiencia o a las condiciones de esterilidad en la que mantuvimos a los ratones. Estos resultados apoyan el concepto de que las condiciones endógenas juegan un papel importante en el desarrollo de la ONM.



# Introducción



# INTRODUCCIÓN

## EL TEJIDO ÓSEO

### Composición

El hueso es un tejido que se encuentra en un constante proceso de remodelado a pesar de su apariencia inerte. Constituye el principal sistema de sostén y protección de los animales vertebrados, pero también tiene otras funciones, como albergar las células precursoras de la hematopoyesis y ser el reservorio de elementos como el calcio y el fósforo.

El tejido óseo está compuesto por una fracción celular y por una matriz extracelular. A diferencia de las matrices de tejido conectivo a otros niveles, la matriz extracelular del hueso se encuentra mineralizada y sufre procesos constantes de regeneración a lo largo de la vida.

Existen tres tipos celulares característicos del hueso: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos se encargan de la formación de hueso y posteriormente quedan sumergidos en la matriz ósea y sufren un proceso de apoptosis o se convierten en células de revestimiento o en osteocitos, mientras que los osteoclastos son las células encargadas de la destrucción del hueso. Estos tres tipos celulares se comunican entre sí mediante contacto directo a través de moléculas señalizadoras<sup>1</sup>.

La matriz extracelular es sintetizada fundamentalmente por los osteoblastos, aunque también contiene proteínas procedentes de la sangre. Esta matriz está compuesta por una fracción orgánica y una inorgánica. El componente orgánico principal es el colágeno tipo I<sup>2</sup>. Entre las demás proteínas que conforman este entramado encontramos proteoglicanos, osteocalcina, osteonectina y proteínas séricas. La fase inorgánica del hueso está compuesta por un análogo de hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ <sup>3</sup>. La función del mineral es fortalecer el componente colagenoso, pero también sirve como fuente de iones de calcio, fosfato y magnesio para mantener la homeostasis mineral.

## **Tipos celulares**

### **Células Mesenquimales**

Las células mesenquimales (MSCs) son células adultas multipotentes de origen mesodérmico que fueron caracterizadas por primera vez en 1970<sup>4</sup>. Estas células pueden aislarse de diferentes tejidos, incluyendo el tejido adiposo y la médula ósea<sup>5</sup>. Las MSCs expresan Stro-1, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, CD271 y CD44 mientras que son negativas para CD45, CD19 y CD14<sup>6</sup>.

Las MSCs se suelen encontrar en un estado de quiescencia, pero en respuesta a determinadas señales son capaces de proliferar para producir más MSCs y además dividirse de manera asimétrica para generar células progenitoras comprometidas con un determinado linaje. Las MSCs conservan la capacidad de diferenciarse a diversos tipos celulares, como osteoblastos, condrocitos, miocitos y adipocitos<sup>7</sup>.

A lo largo de los últimos años, las MSCs se han propuesto como candidatas para terapias celulares. Las MSCs son hipoinmunogénicas porque expresan niveles bajos de antígenos de histocompatibilidad, por lo que en principio deben de plantear menos problemas de rechazo por parte del huésped. Sin embargo, en caso de utilizarse, sería preferible su uso en forma de autoinjertos en lugar de aloinjertos para eliminar así las preocupaciones acerca de una posible reacción inmune y otros riesgos asociados a los alo-trasplantes<sup>8</sup>.

Existen dos diferentes formas generales de emplear terapias basadas en MSCs. La primera consiste en utilizar estas células en su estado indiferenciado, permitiendo la diferenciación in situ. La desventaja principal de este abordaje es que las células podrían diferenciarse a tipos celulares distintos al deseado. La segunda opción consiste en inducir una diferenciación in vitro previamente a la inyección de las células<sup>9</sup>. Este segundo enfoque minimiza el riesgo de fracasos, pero requiere asegurar una diferenciación in vitro exitosa, con un riguroso control técnico. Además de la capacidad para diferenciarse hacia células maduras, las MSCs presentan otras características interesantes, ya que pueden producir y secretar citoquinas y factores de crecimiento que pueden ejercer acciones anabólicas sobre tejidos diana. Estudios recientes reflejan

que las MSCs contribuyen a la regeneración de tejidos no solo gracias a su capacidad pluripotente, sino además mediante la estimulación de células del huésped a través de mecanismos paracrinos<sup>10 11</sup>. Se considera que los exosomas son una de las claves para entender el efecto paracrino que ejercen las MSCs. Los exosomas son nanovesículas extracelulares que contienen, entre otros, microRNAs (miRNAs) y citoquinas y median en la comunicación intercelular transportando información genética. Se ha demostrado, por ejemplo, que los exosomas producidos por las MSCs pueden estimular la proliferación de los osteoblastos estimulando la vía de las MAPK<sup>12</sup> así como la angiogénesis a través de la acción de miRNAs<sup>13</sup>.

La diferenciación de las MSCs a los diferentes tipos celulares depende de vías de señalización y de reguladores de la transcripción que funcionan a modo de “interruptores” moleculares que inducen los cambios en la expresión de genes y, en consecuencia, las características fenotípicas, de las diversas estirpes celulares diferenciadas

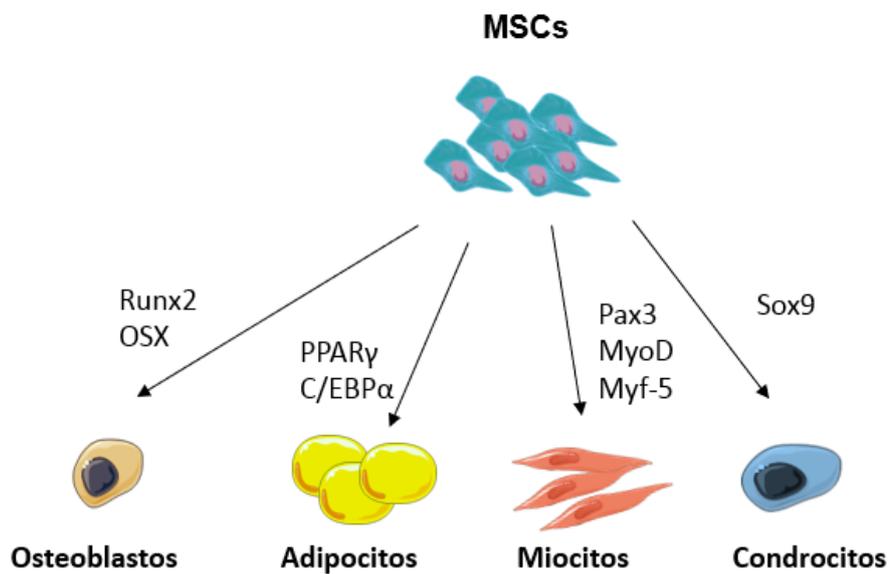


Figura 1. Diferenciación de las MSCs hacia distintos tipos celulares. RUNX2: Runt related transcription factor 2. OSX: Osterix. PPAR $\gamma$ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor. C/EBP $\alpha$ : CCAAT: Enhancer Binding Proteins. MyoD: Myoblast Determination Protein 1. Myf5: Myogenic Factor 5. SOX9: SRY-related high mobility group-box gene 9.

## Diferenciación osteoblástica

La inducción de la diferenciación de las MSCs hacia el linaje de los osteoblastos está determinada por factores de transcripción, vías de señalización y mecanismos epigenéticos, así como por factores físicos y químicos.

### 1. Factores de transcripción

Los factores de transcripción promueven la diferenciación hacia un tipo celular específico al regular la expresión de los genes característicos de esa célula.

El Runt related transcription factor 2 (Runx2) también conocido como core binding  $\alpha$ 1 (Cbfa1) constituye un interruptor clave para promover la diferenciación de MSCs a preosteoblastos e inhibir la diferenciación a adipocitos. Esto queda claramente demostrado por la ausencia completa de osteoblastos en ratones deficientes de Runx2<sup>14</sup>. Sin embargo, el Runx2 no juega un papel crucial en la diferenciación hacia osteoblastos maduros y su expresión se va reduciendo a lo largo de la diferenciación<sup>15</sup>  
<sup>16</sup>.

En humanos, las inserciones, deleciones y mutaciones puntuales heterocigotas de Runx2 pueden derivar en displasia cleidocraneal (CDD), una enfermedad rara caracterizada por un defecto en el desarrollo de los huesos del cráneo y la ausencia completa o parcial de clavículas<sup>17</sup>. Mediante la interacción con otras proteínas co-reguladoras, Runx2 puede regular de manera positiva o negativa la expresión de una variedad de genes específicos del linaje de los osteoblastos, incluyendo el colágeno tipo I (Col1a1), la fosfatasa alcalina (ALPL), la osteoprotegerina (OPN) y la osteocalcina (OC o BGLAP)<sup>18 19</sup>. Por otro lado, Runx2 regula la expresión del factor de transcripción Osterix (Osx) que resulta también relevante en la osteoblastogénesis. De manera similar a lo que ocurre en ratones deficientes de Runx2, los ratones Osx -/- carecen de osteoblastos<sup>20</sup>. La expresión de Osx resulta en un aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina y de la mineralización<sup>20 21</sup>.

## 2. Vías de señalización

### - Vía de las proteínas morfogenéticas óseas (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs)

Las BMPs son citoquinas que pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Existen al menos 30 tipos de BMPs identificadas en humanos, varias de las cuales modulan la diferenciación de las MSCs. A menudo, como sugiere su nombre, las BMPs favorecen la diferenciación hacia la línea osteoblástica y la formación de hueso. Pero este no es un fenómeno universal. Por ejemplo, la activación de los receptores tipo 1b de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP type 1b receptor, BMPR-1B) favorece la osteogénesis, mientras que BMPR-1A favorece la adipogénesis<sup>22</sup>. Runx2 (junto con otras moléculas como Smad1 y 5) controla la expresión genética y diferenciación osteogénica inducida por las BMPs<sup>23 24</sup>. Además, se ha visto que BMP-2 induce también la expresión de Osx<sup>25</sup>.

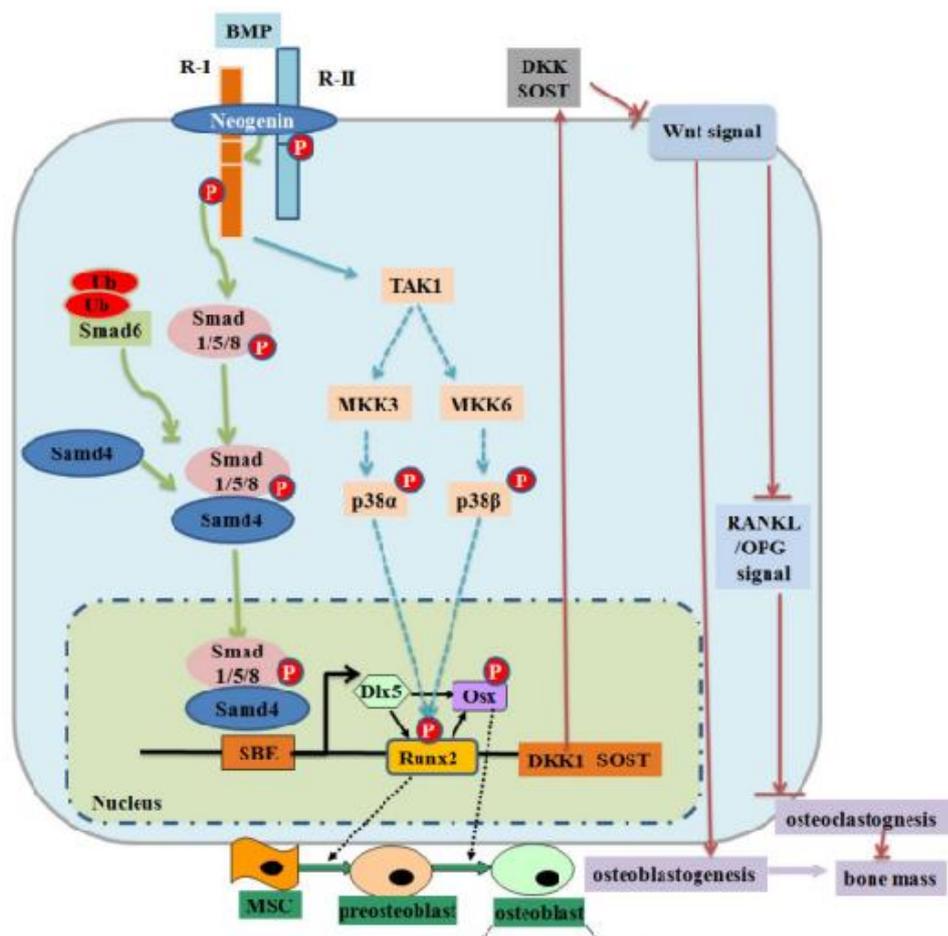


Figura 2. Señalización de las BMPs en la regulación e la formación ósea. Figura tomada de Chen et al<sup>26</sup>. Las BMPs se unen a los receptores tipo I y tipo II produciendo una activación de las Smads. Las Smads activadas forman un complejo con Smad 4 y se translocan al núcleo donde interactúan con otros factores de transcripción que intervienen en la regulación de la osteoblastogénesis. Además, las BMPs también intervienen en la regulación de la formación ósea a través de la vía de las TAK I. El receptor de las BMPs tipo I aumenta la expresión de SOST mientras que aumenta DKK I. Tanto SOST como DKK I inhiben la vía Wnt canónica lo cual conlleva una disminución en la osteogénesis.

#### - Vía Wnt (“wingless”)

La vía Wnt es una vía de señalización compleja en la que participan numerosos componentes. Esta vía no es exclusiva del hueso y se sabe que interviene también en otros procesos, como la embriogénesis, la organogénesis y el desarrollo de tumores<sup>27 28</sup>. Los mecanismos mejor conocidos de transmisión de la señal de los ligandos Wnt se incluyen en la llamada vía canónica o clásica, en la cual la  $\beta$ -catenina desempeña un papel central. Existen además otras vías alternativas o no canónicas que emplean otros mediadores.

La vía Wnt canónica constituye un mecanismo esencial para la regulación del remodelado, ya que controla la proliferación, diferenciación y apoptosis de los osteoblastos. En condiciones basales, cuando la vía no se encuentra activada, existe un complejo proteico que incluye la axina, la proteína de la poliposis adenomatosa del colon (APC) y la glucógeno sintasa cinasa 3b (GSK3). La GSK3 fosforila la  $\beta$ -catenina, lo que permite que se una a la ubiquitina para ser posteriormente degradada en los proteasomas. En esta situación basal los niveles intracelulares de  $\beta$ -catenina se mantiene relativamente bajos.

Cuando se produce la unión de los ligandos Wnt a su receptor se desencadena la activación de la vía. Esta unión se produce a través de la unión de los ligandos con receptores de membrana frizzled (familia de receptores transmembrana serpenteados con siete dominios) y con un co-receptor relacionado con el de las LDL (lipoprotein receptor related peptide o LRP). Existen dos formas principales de LRP: la 5 y la 6. La unión de los ligandos Wnt al complejo frizzled-LRP5/6 promueve la separación del

complejo axina-APC-GSK3, disminuyendo así la actividad de la GSK3 y consecuentemente la fosforilación de la  $\beta$ -catenina y su degradación en los proteasomas. Al disminuir la degradación de la  $\beta$ -catenina, ésta se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo, donde regula la expresión génica a través de la activación de diversos factores de transcripción<sup>29</sup>. La delección condicional de la  $\beta$ -catenina promueve la diferenciación de las MSCs hacia condrocitos en lugar de hacia osteoblastos durante los procesos de osificación intramembranosa y endocondral<sup>30</sup>. Todos estos hallazgos corroboran la relevancia de la participación de la vía Wnt en la formación ósea. Existen diversas moléculas capaces de antagonizar la vía Wnt al competir con los ligandos Wnt por su receptor. Una de estas moléculas antagonistas es la esclerostina, codificada por el gen SOST, que se expresa sobre todo en los osteocitos, pero también en algunas otras células, como los condrocitos<sup>31</sup>. Mutaciones en el gen SOST pueden dar lugar a raros trastornos con una masa ósea aumentada como la esclerostosis o la enfermedad de Van Buchem<sup>32 33</sup>.

Las moléculas de la familia dickkopf (Dkk) también son capaces de antagonizar la vía Wnt mediante la unión a los co-receptores LRP5/6. Hay al menos cuatro miembros de esta familia de los cuales el tipo 1 (Dkk-1) es especialmente importante en el hueso<sup>34</sup>. Ratones transgénicos heterocigotos Dkk-1 +/- presentan un aumento de masa ósea<sup>35</sup> mientras que aquellos ratones transgénicos con sobreexpresión ósea de Dkk-1 desarrollaban osteopenia<sup>36</sup>.

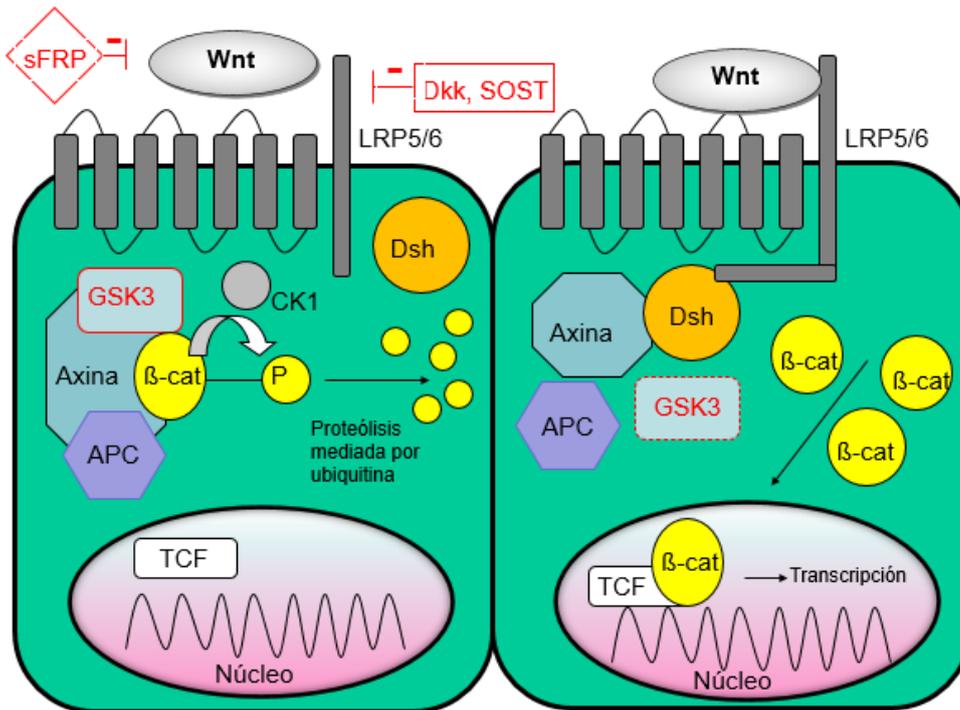


Figura 3. Vía canónica: en ausencia de unión de los ligandos Wnt a su receptor (izquierda), lab-catenina se degrada y los genes no se transcriben. Sin embargo, cuando se activa la vía (derecha) disminuye la degradación de la  $\beta$ -catenina, con lo que se acumula en el citoplasma, desde donde puede entrar en el núcleo y activar los factores de transcripción. APC: proteína de la poliposis adenomatosa del colon; b-cat:b-catenina; cK: caseína-cinasa; Dsh: dishevelled; GSK3: glucógeno sintasa cinasa 3b; sFRP: proteína soluble similar a frizzled; SOST: esclerostina. (Velasco y Riancho<sup>37</sup>).

Las vías BMP y la Wnt canónica parecen interactuar en distintos puntos de la osteogénesis. La vía de las BMPs tiene una especial relevancia en fases iniciales, al inducir la diferenciación de las MSCs hacia osteoprogenitores. Tras esto, la activación de la vía Wnt clásica favorece la diferenciación de estos osteoprogenitores hacia osteoblastos.

#### - Vía Hedgehog

Existen 3 proteínas Hedgehog en los mamíferos: Sonic, Indian (Ihh) y Deserte hedgehog. Ihh juega un papel importante en el desarrollo del esqueleto y en la proliferación celular. A través de la activación del factor de transcripción Gli2, el Ihh

produce un incremento en la expresión y función de Runx2 estimulando así la osteoblastogénesis<sup>38</sup>.

En el cartílago en desarrollo, se expresa el Ihh en condrocitos prehipertróficos y en los hipertróficos tempranos. Durante el proceso de osificación endocondral se ha comprobado que Ihh es esencial para el desarrollo de los osteoblastos, ya que los ratones deficientes de Ihh carecen por completo de osteoblastos por su incapacidad para expresar Runx2<sup>39</sup>.

#### - Vía Notch

Las proteínas Notch constituyen un grupo de receptores transmembrana que controlan la diferenciación de diversos tipos celulares e inhiben la diferenciación de las MSCs hacia osteoblastos<sup>40</sup>. En las células precursoras de osteoblastos, la proteína Notch estimula la expresión de la proteína Hey1 que interactúa a su vez con Runx2 inhibiendo su actividad transcripcional y consecuentemente la diferenciación hacia osteoblastos.

#### - Factor de crecimiento fibroblástico (Fibroblast Growth Factor, FGF)

Los FGFs son importantes reguladores de la osificación endocondral y membranosa y de la apoptosis, afectando tanto en la osteoblastogénesis como en la condrogénesis. Se sabe que los FGFs inducen la proliferación de osteoblastos inmaduros a través de la vía Ras/ERK/MAPK y mediante estimulación de la actividad de Runx2<sup>41</sup>.

#### - Paratohormona (PTH)

La PTH y su péptido relacionado (PTHrp) pueden tener un efecto tanto anabólico como catabólico sobre el hueso. Mientras que la administración intermitente de PTH favorece la osteogénesis, la administración continua predispone a la pérdida de masa ósea. Se observó que la PTH es capaz tanto de aumentar como de disminuir la actividad de Runx2, en función de las condiciones experimentales concretas, así como de inhibir la expresión de Osx<sup>42 43</sup>.

### 3. Otros factores

Como hemos visto, existen factores intracelulares que juegan un papel crítico en la osteogénesis. Además, se ha demostrado que factores externos, tanto físicos como químicos también influyen en la diferenciación de las MSCs a través de la modulación de señales intracelulares y de factores de transcripción.

En cuanto a los factores físicos, se conoce que el ejercicio físico<sup>44 45</sup> y la vibración<sup>46 47</sup> estimulan la osteoblastogénesis mientras que la ingravidez y la inmovilización actúan como factores antiosteogénicos y proadipocíticos<sup>48 49</sup>. Algunos estudios han mostrado que la vibración promueve la osteogénesis mediante una regulación positiva de Runx2 y una inhibición de PPAR $\gamma$  (que es el factor de transcripción más relevante de la diferenciación de MSCs hacia adipocitos)<sup>50</sup> mientras que se piensa que la ingravidez ejerce una regulación contraria sobre estos factores de transcripción. Los estímulos mecánicos tienden a reducir la producción de esclerostina. A la inversa, un aumento de los niveles de esclerostina parece ser responsable, al menos en parte, de la pérdida de masa ósea secundaria a la inmovilización<sup>51</sup>. No obstante, los mecanismos moleculares mediante los cuales estos factores físicos actúan sobre el hueso están aún por aclarar completamente.

Una dieta adecuada es importante para el mantenimiento de la homeostasis mineral normal, en particular en lo que se refiere al aporte de elementos clave para la formación del tejido óseo, como proteínas, calcio, fósforo y vitamina D. Por otro lado, se ha comprobado que una dieta rica en grasa inhibe la formación de hueso mientras que promueve la adipogénesis mediante la regulación de genes implicados como por ejemplo el PPAR $\gamma$ <sup>52 53</sup>.

#### **Osteoblastos**

Como hemos dicho, los osteoblastos son células que derivan de las MSCs. Una vez las MSCs, se diferencian a osteoblastos maduros, el siguiente paso consiste en la elaboración de una matriz ósea mineralizada por parte de los osteoblastos.

El proceso de crecimiento y diferenciación de los osteoblastos se divide en varias fases que podemos distinguir en función de los marcadores que se expresan en cada una de ellas:

1. Proliferación de las células osteoprogenitoras, con la expresión de genes como osteopontina (OPN), Col1a1 y TGF  $\beta$ .
2. Maduración de la matriz extracelular, con la expresión de proteínas de la matriz ósea como la sialoproteína ósea (BSP), ALPL y Col1a1.
3. Mineralización de la matriz ósea. Requiere la expresión de osteocalcina (OC) y OPN.

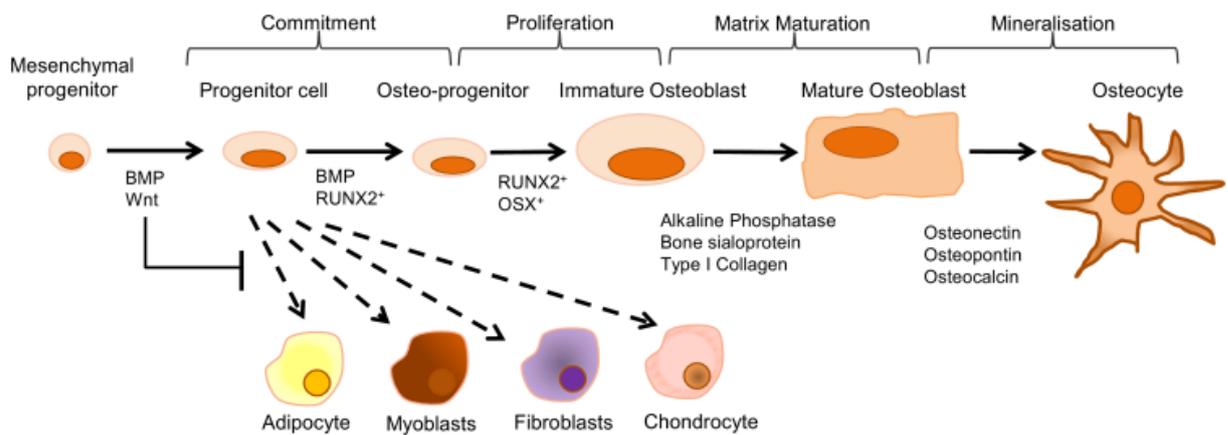


Figura 4. Esquema de la diferenciación de las MSCs hacia diferentes tipos celulares. Las vías Wnt y BMP así como los factores de transcripción RUNX2 y OSX dirigen a las MSCs hacia la diferenciación osteoblástica. Durante la fase de osteoblasto inmaduro se produce la expresión de fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea y colágeno tipo I mientras que en fases más maduras se expresarán la osteonectina, osteocalcina y osteopontina. Algunos osteoblastos maduros quedarán embebidos en la matriz ósea y se convertirán en osteocitos. Tomada de Collins F<sup>54</sup>.

## Osteocitos

La mayor parte de los osteoblastos sufren un proceso de apoptosis<sup>55</sup> tras la síntesis del osteoide, pero algunos quedan como células de superficie o de revestimiento ("lining cells", células planas que cubren las superficies del tejido óseo en las que no se están desarrollando procesos de remodelado), mientras que otros son

embebidos en la matriz ósea y se transforman en osteocitos<sup>56</sup>. Los osteocitos conforman en torno al 90-95% del componente celular del esqueleto adulto<sup>57</sup> (frente a un 4-6% de osteoblastos y un 1-2% de osteoclastos). Se encuentran localizados en lagunas, dispersos por la matriz ósea, y se conectan entre sí y con otros tipos celulares mediante procesos dendríticos a través de canaliculos<sup>58</sup> que les permiten la comunicación intercelular por medio de uniones tipo gap.

Los osteocitos son células con múltiples funciones, ya que intervienen en el remodelado óseo, en la adaptación a los cambios mecánicos y en la homeostasis mineral.

Los osteocitos juegan un papel fundamental en el control del remodelado mediante la liberación de sustancias como la osteoprotegerina (OPG)<sup>59</sup>, el RANKL (Ligando Receptor Activador para el Factor Nuclear  $\kappa\beta$ , Receptor Activator for Nuclear  $\kappa\beta$ ) o la esclerostina<sup>60</sup> en respuesta a estímulos hormonales o mecánicos.

La muerte programada de los osteocitos desempeña una labor importante orquestando el inicio del remodelado óseo. La apoptosis de los osteocitos está desencadenada por un insulto a la matriz ósea de manera que se produce en lugares que han sufrido un daño o "microcrack". La aparición de estos osteocitos apoptóticos estimula la actividad de los osteoclastos que inician el remodelado<sup>61</sup>.

Los osteocitos intervienen además en el metabolismo mineral. Entre otras acciones, liberan el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) que interviene en la regulación de los niveles de fósforo<sup>62</sup>. El FGF-23 inhibe la resorción de fósforo y la producción renal de 1,25 dihidroxivitamina D3 [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] y suprime la síntesis de PTH en la glándula paratiroides lo cual reduce los niveles circulantes de fósforo<sup>63</sup>.

### **Osteoclastos**

Los osteoclastos son células grandes multinucleadas que se forman a partir de la fusión de precursores mononucleares de origen hematopoyético<sup>64</sup>. Las dos citoquinas esenciales para el desarrollo y supervivencia de los osteoclastos son el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y el RANKL. Ambos son necesarios para

inducir la expresión de los genes característicos del linaje de los osteoclastos como el TRAP (tartrate resistant acid phosphatase), la catepsina K (CATK) o el receptor de la calcitonina.

Diversas células de la línea osteoblástica expresan RANKL, siendo los osteocitos su fuente principal. La unión del ligando RANKL con el receptor de membrana RANK, expresado en los precursores de los osteoclastos, supone un estímulo para inducir la diferenciación de estos precursores hacia osteoclastos maduros y un aumento de la actividad de estos últimos, a través de la expresión de TRAF-6 (factor asociado al receptor del TNF) y la activación de NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa beta)<sup>65</sup>.

Por otro lado, las células de la estirpe osteoblástica son capaces también de producir la OPG, que puede unirse a RANKL impidiendo así la unión de este con su receptor y evitando la diferenciación de los precursores osteoclasticos. La activación de la vía Wnt promueve la producción de OPG, de manera que los ligandos Wnt no solo favorecen la osteoblastogénesis, sino que inhiben la diferenciación de precursores hacia osteoclastos maduros.

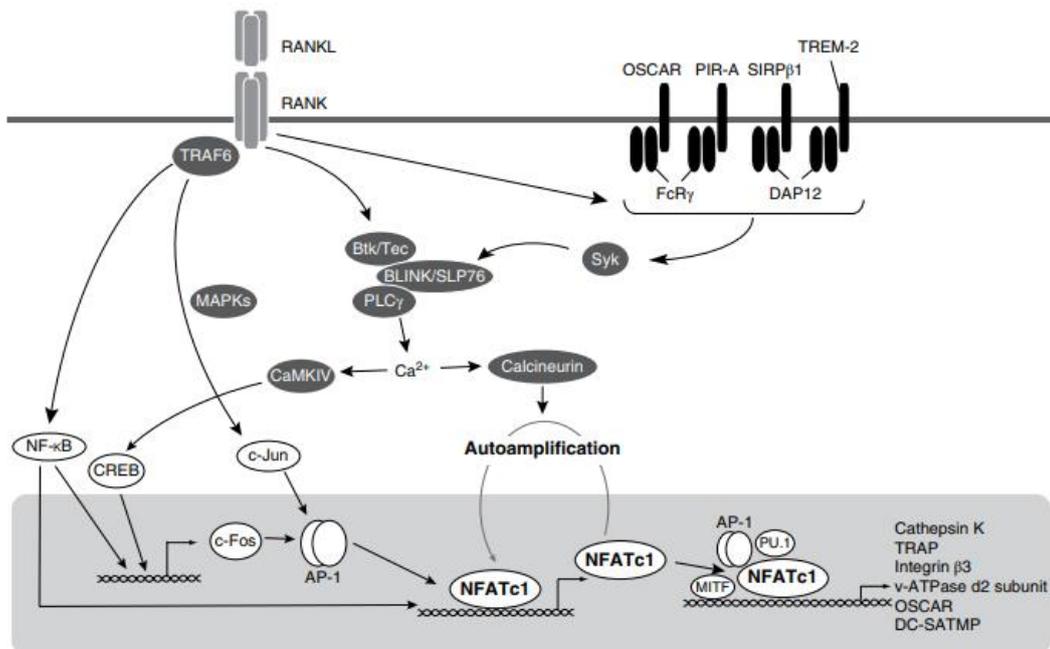


Figura 5. Cascadas de señalización durante la osteoclastogénesis. RANKL se une a RANK durante el reclutamiento de TRAF 6 que activa MAPK y NF- $\kappa$ B. RANKL también estimula la

inducción de c-Fos, un componente de AP-1. NF- $\kappa$ B y AP-1 son importantes para la inducción de NFA Tc1. NFATc1 controla la expresión de una variedad de genes específicos de los osteoclastos en cooperación con otros factores de transcripción osteoclastogénicos. Imagen tomada del capítulo 6 del ASBMR Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 9 ed (Bilezikian JP, ed.) 2019.

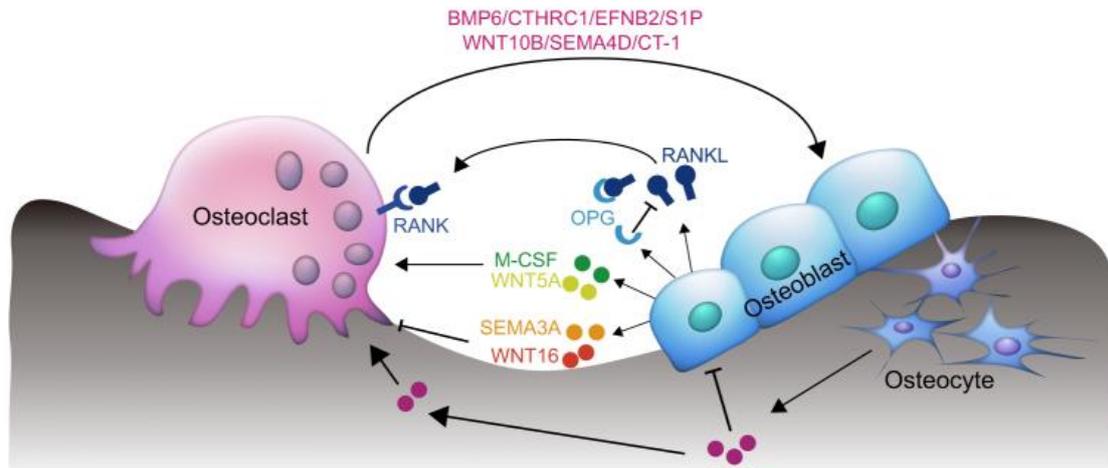


Figura 6. Acciones paracrinas de osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos activan la formación de osteoclastos mediante la expresión de RANKL, M-CSF y WNT51 e inhiben la actividad osteoclástica a través de la OPG. Imagen tomada de Han et al<sup>66</sup>.

La función de los osteoclastos consiste en la resorción del hueso. Para llevar a cabo esta función, el osteoclasto se adhiere a los tejidos calcificados, desarrolla el llamado “borde en cepillo” y secreta ácidos, proteasas (catepsina K) y enzimas lisosomales a la región bajo este borde<sup>67</sup>. La secreción ácida produce una disolución de la matriz inorgánica mientras que la liberación de las proteasas desencadena la degradación de las proteínas de la matriz. Los osteoclastos internalizan los productos de degradación de la matriz en vesículas endocíticas que son evacuadas por el polo opuesto de la célula.

## REMODELADO Y MODELADO ÓSEO

La primera fase del remodelado óseo consiste en la resorción ósea mediada por los osteoclastos. Tras el reclutamiento y diferenciación de los precursores de osteoclastos, los osteoclastos maduros excavan una cavidad o laguna en una superficie trabecular (o en un túnel en el hueso compacto cortical). El hueso retirado por los

osteoclastos es posteriormente reemplazado por nuevo hueso formado por los osteoblastos. Este proceso, perfectamente orquestado, está regulado por una compleja interacción de hormonas y de factores locales.

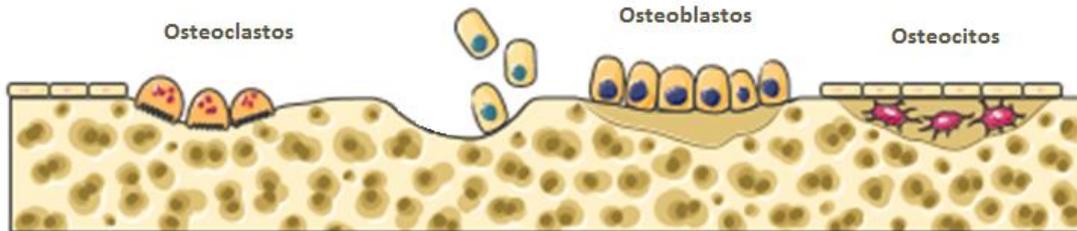


Figura 7. Durante el proceso de remodelado, la actividad de osteoclastos y osteoblastos se encuentra acoplada en tiempo y espacio. Es importante que exista un equilibrio entre ambas fases, formación y resorción, para que se mantenga la homeostasis esquelética. Es evidente que un desequilibrio entre ambas fases puede resultar en una enfermedad del esqueleto, con aumento o disminución de la masa ósea, dependiendo de que predomine la formación sobre la resorción, o viceversa. Los osteoclastos maduros excavan una laguna y el hueso retirado es posteriormente reemplazado por nuevo hueso formado por los osteoblastos. Tras este proceso, parte de los osteoblastos quedan embebidos en la matriz ósea y se transforman en osteocitos.

El modelado óseo, sin embargo, es un proceso de formación ósea en el cual la actividad entre osteoclastos y osteoblastos no está necesariamente acoplada. Por ejemplo, porque tiene lugar un proceso de osteogénesis en zonas del tejido óseo que no habían sufrido previamente un proceso de resorción. El modelado óseo se produce fundamentalmente en las primeras etapas de la vida, durante el periodo de crecimiento, aunque se mantiene a menor escala durante la vida adulta. Las anomalías en el modelado óseo pueden desembocar en el desarrollo de displasias o dismorfias. Los procesos de modelado son también esenciales en la consolidación de las fracturas y la reparación de otras lesiones esqueléticas.

De manera no invasiva, a través de muestras de sangre o de orina, se puede obtener cierta información acerca del remodelado óseo mediante los marcadores de remodelado. El propéptido amino-terminal del procolágeno tipo 1 (P1NP), la fosfatasa alcalina ósea y la osteocalcina son los marcadores de formación ósea más comúnmente usados. Entre los marcadores de resorción ósea, encontramos algunos productos de

degradación del colágeno, como los “crosslaps” (telopéptido c terminal del colágeno tipo 1, CTX)<sup>68</sup> y la enzima TRAP5b, que es expresada activamente por los osteoclastos<sup>69</sup>.

## **CONSOLIDACIÓN DE FRACTURAS**

### **Vías de consolidación**

El proceso de reparación ósea es esencial tras el desarrollo de una fractura y requiere una actividad coordinada entre diferentes tipos celulares. La reparación del hueso puede llevarse a cabo a través de una vía directa (osificación intramembranosa) o indirecta (intramembranosa y endocondral)<sup>70</sup>. La vía más frecuente es la indirecta, ya que la directa requiere que se lleve a cabo una reducción abierta de la fractura y una fijación interna.

La consolidación indirecta o secundaria es, pues, la más común. En ella se recapitulan los procesos de osificación que tienen lugar normalmente durante el periodo de crecimiento, en el cual se forma el esqueleto a través de procesos de osificación intramembranosa (que supone la formación directa de nuevo hueso a través de osteoblastos originados gracias a la diferenciación de sus precursores, las MSCs) y endocondral (en la cual se forma primero un “molde” cartilaginosa que es después sustituido por tejido óseo). Cuanto mejor fijada se encuentre la fractura (es decir, menor inestabilidad), mayor será la proporción de osificación intramembranosa respecto a la endocondral.

Tras el traumatismo se interrumpe la circulación sanguínea a nivel del defecto óseo y se generan un hematoma y una respuesta inflamatoria que incluye la liberación de factores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y las interleuquinas (IL) 1, 6, 11 y 18<sup>71</sup>. Esta respuesta propicia que el hematoma se coagule en los extremos de la fractura. Es ahí donde va a tener lugar la osificación endocondral.

Las MSCs, que residen en distintas localizaciones, incluidos el periostio, la médula ósea y el músculo, son reclutadas y se estimula su proliferación y su diferenciación a osteoblastos para facilitar la osteogénesis intramembranosa en las localizaciones distales a la fractura con un adecuado riego sanguíneo; en particular, junto a los

extremos de las corticales fracturadas. Además, se estimula la diferenciación de las MSCs a condrocitos para facilitar la formación de hueso endocondral en las zonas hipóxicas adyacentes a la fractura<sup>72</sup>. La diferenciación de las MSCs hacia el linaje de los condrocitos en las zonas con vascularización interrumpida apoya el concepto de que la hipoxia es un inductor de condrogénesis<sup>73</sup>. Al tejido que se va formando se le denomina callo de fractura. Los condrocitos en la periferia del callo sufren un proceso de diferenciación terminal. El cartílago calcificado actúa como una plantilla para la formación de hueso y se va produciendo una mineralización progresiva de la matriz. Posteriormente, los condrocitos diferenciados ubicados en la matriz calcificada sufren un proceso de apoptosis y se inicia una fase de remodelado mediada por osteoclastos para la retirada del cartílago restante en respuesta al M-CSF, RANK, RANKL y OPG<sup>74</sup>.

En una posición distal al foco de fractura, y flanqueando a los condrocitos que llevan a cabo la osificación endocondral, se produce la osificación intramembranosa. Este proceso se caracteriza por la diferenciación de MSCs a osteoblastos que forman osteoide e inducen mineralización sin necesidad de la formación intermedia de cartilaginosa.

Se considera que las fracturas están curadas cuando se restablece la estabilidad del hueso mediante la formación de puentes de nuevo hueso sobre el área de fractura. Sin embargo, este hueso nuevo no presenta las características definitivas del hueso normal. La matriz ósea inmadura inicial (tipo "hueso fibroso") es reemplazada por un hueso laminar más organizado a través de un segundo proceso de remodelado, mediado nuevamente por osteoclastos. En esta fase se produce una resorción del callo por parte de los osteoclastos y una formación de hueso laminar por parte de los osteoblastos.

Para que el remodelado óseo sea exitoso, es necesario un adecuado aporte sanguíneo siendo fundamental la revascularización y neoangiogénesis en la zona de la fractura.

El proceso de consolidación se completa con el desarrollo de una estructura estable similar a la existente antes de la fractura.

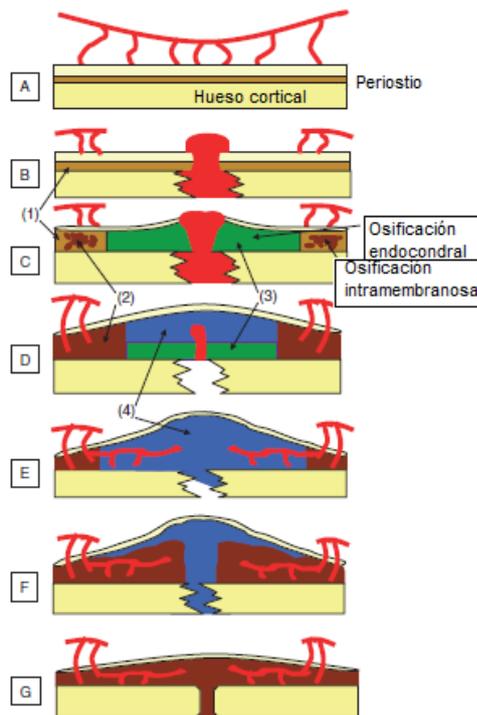


Figura 8. Cambios en el tejido durante la reparación ósea. A) El periostio es un tejido bien vascularizado que además contiene MSCs. B) Tras una fractura el aporte sanguíneo se ve interrumpido y se forma un hematoma. C) En los lugares con buen aporte sanguíneo, las MSCs se van a diferenciar a osteoblastos para favorecer la osificación intramembranosa (1). Por el contrario, en los lugares donde el aporte sanguíneo se encuentre interrumpido, las MSCs se van a diferenciar a condrocitos para facilitar la osificación endocondral. D) Tras la osificación intramembranosa se produce una mineralización del nuevo tejido (2). E) Se produce una mineralización del tejido cartilaginoso formando el callo de la fractura. Comienza revascularización en la zona del callo. F) Diferenciación terminal de los condrocitos del callo. Mineralización progresiva de la matriz ósea inmadura. G) Resorción del callo por parte de los osteoclastos y una formación de hueso laminar por parte de los osteoblastos. Imagen tomada del capítulo 15 del ASBMR Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 9 ed (Bilezikian JP, ed.) 2019.

### **Alteraciones de la consolidación**

Las alteraciones de la consolidación forman parte de las complicaciones locales de las fracturas. Aunque la incidencia va a depender de la localización de la fractura, se estima que se producen en torno a un 5-10% de ellas<sup>75</sup> y las podemos clasificar en retraso

de la consolidación y pseudoartrosis. La mayor parte de las fracturas consolidan en un periodo de 4-6 semanas (aunque, como hemos dicho, la remodelación final del callo se prolonga durante varios meses). Se conoce como “retraso en la consolidación” cuando la consolidación no ha avanzado a la velocidad esperada para la localización y el tipo de fractura (4-6 meses). La curación incompleta de una fractura, en la cual los extremos de hueso cortical no llegan a reconectar entre si mediante hueso nuevo, sino que a lo sumo quedan ligados por un puente fibroso laxo, se denomina pseudoartrosis.

La tasa de desarrollo de pseudoartrosis suele estar en torno al 5-10% de las fracturas<sup>76 77</sup> y las localizaciones más susceptibles de desarrollar esta complicación son el húmero, el fémur y la tibia<sup>78</sup>. En un estudio realizado en Inglaterra, se estudiaron 4715 fracturas en adultos observando que la tasa global de la pseudoartrosis era menor de la habitual (1.9%) y que frecuencia era mayor en las fracturas de extremidades inferiores (tibia y peroné)<sup>79</sup> y menor en las fracturas de mano.

Las pseudoartrosis se suelen presentar en forma de dolor persistente, tumefacción o inestabilidad, pasado el tiempo estimado de curación de la fractura. Algunas pseudoartrosis son asintomáticas y no precisan tratamiento. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las pseudoartrosis son sintomáticas y precisan de tratamiento mediante reducción abierta y fijación.

Existen numerosos factores que dificultan el proceso de reparación y en consecuencia propician alteraciones en la consolidación de una fractura<sup>80</sup>. Entre ellos, una vascularización local pobre, un acercamiento insuficiente de los fragmentos óseos, una afectación extensa del tejido blando circundante, infección local o factores propios del individuo fracturado, como la edad, obesidad, diabetes, osteoporosis, consumo de tóxicos<sup>81 82</sup>o algunos medicamentos. Entre los tratamientos que se han asociado con alteraciones de la consolidación encontramos los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), antibióticos como las quinolonas<sup>83</sup> y los anticoagulantes (al dificultar el desarrollo del coágulo organizado precursor de la osificación endocondral). En algunos estudios se sugirió un aumento de riesgo de alteraciones en la consolidación en pacientes en tratamiento con bifosfonatos<sup>84</sup>, pero esos resultados no fueron corroborados por otros autores<sup>85</sup>, por lo que esta sigue siendo una cuestión debatida.

## ENFERMEDADES PREVALENTES DEL ESQUELETO

### Osteoporosis

#### Definición

La osteoporosis (OP) es la enfermedad metabólica ósea más prevalente. Se trata de un desorden del esqueleto que se caracteriza por una baja masa ósea y una alteración en la microarquitectura del hueso que conlleva un aumento de la fragilidad ósea y del riesgo de fractura<sup>86</sup>.

El término “osteoporosis” es de origen griego (“hueso poroso”) y se introdujo por primera vez en el siglo XX<sup>87</sup>. Clínicamente la OP ha sido difícil de definir. De acuerdo con los criterios publicados en 1994 por un grupo de expertos auspiciados por la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>88</sup>, se define la OP como un valor de densidad mineral ósea (DMO) en índice T en columna lumbar o en cuello femoral igual o menor a 2,5 desviaciones estándar.

El método empleado para la determinación de la DMO es la densitometría (DXA) o absorciometría de rayos X de energía doble<sup>89</sup>. Esta técnica permite realizar una estimación del tejido calcificado a través de la medición de la atenuación. Los resultados suelen expresarse como DMO, que es un buen indicador de la masa ósea y se correlaciona con la resistencia del hueso y con el riesgo de fracturas. El índice T representa el número de desviaciones estándar que se aparta el sujeto respecto a la media de los valores de un grupo poblacional de adultos jóvenes del mismo sexo.

$$T \text{ score} = \frac{\text{DMO medida} - \text{DMO media de adulto joven}}{\text{Desviación estándar de población de adultos jóvenes}}$$

Un valor de índice T por encima de -1 se considera como normal; un valor entre -1 y -2.5 como osteopenia, y por debajo de -2.5 como osteoporosis. No obstante, últimamente se recomienda sustituir el término osteopenia por “baja masa ósea” o “baja DMO”.

<b>Clasificación de la densidad mineral ósea (DMO) según la OMS (1994)<sup>88</sup></b>	
Normal	Valor de DMO <1 DE por debajo del promedio para adultos jóvenes.
Osteopenia	Valor de DMO entre 1 y 2.5 DE por debajo del promedio para adultos jóvenes.
Osteoporosis	Valor de DMO > 2.5 DE por debajo del promedio para adultos jóvenes.
* DE: desviación estándar	

Tabla 1. Clasificación de la densidad mineral ósea según la OMS.

Los estudios densitométricos tienen tres utilidades principales: el diagnóstico de la osteoporosis, la evaluación del riesgo de fractura y la monitorización de la evolución.

Las fracturas más comúnmente relacionadas con la fragilidad ósea son las fracturas de cadera (fémur proximal), las de humero distal y las vertebrales. Sin embargo, la OP es una enfermedad sistémica y los pacientes afectados presentan un riesgo aumentado de fractura a todos los niveles. Aquellos individuos que ya han presentado una fractura por fragilidad se encuentran en mayor riesgo de presentar otra<sup>90</sup>. Con cada descenso de una desviación estándar de la DMO, se incrementa el riesgo de fractura entre 1,4 y 2,1 veces, dependiendo de la edad del individuo y del tipo de fractura.

### Epidemiología

La OP supone un importante problema de Salud Pública, dada su asociación con el aumento en el riesgo de fracturas. Existe un aumento progresivo de la incidencia de OP, paralela al envejecimiento demográfico, observado tanto en España como en otros países. Se ha estimado que, en población blanca, en torno al 50% de las mujeres y el 20% de los hombres en la década de los 50 años, tendrán una fractura fragilidad durante el resto de su vida<sup>91</sup>.

La incidencia de las fracturas es bimodal, con un pico en la juventud y otro en individuos de avanzada edad<sup>92</sup>. En los sujetos jóvenes predominan las fracturas a nivel de los huesos largos y suelen ser secundarias a traumatismos de alto impacto. El

segundo pico de incidencia de fracturas se debe fundamentalmente a las fracturas por fragilidad, incluyendo, entre otras, las de cadera, las vertebrales y las de radio distal. Estas fracturas comparten ciertas características entre sí: su incidencia aumenta con la edad; son más frecuentes en mujeres y se producen como consecuencia de traumatismos de baja o moderada intensidad<sup>93</sup>.

Entre todas las fracturas por fragilidad, las fracturas de cadera son las que suponen un mayor impacto, tanto en morbi-mortalidad, como en carga económica<sup>94</sup>. La mayor parte de las fracturas de cadera precisan de hospitalización y en muchos casos el abordaje inicial es quirúrgico, por lo que su registro resulta más sencillo que el de las fracturas a otros niveles. Se estima que cada año se producen en España en torno a 45 000 fracturas de cadera en personas por encima de los 65 años<sup>95</sup>, lo cual conlleva un elevado coste sanitario. Se estima que en torno a un 90% de las fracturas de cadera se producen en individuos por encima de los 50 años y que por encima de la década de los 50 se producen el doble de casos en mujeres que en hombres. Existen importantes diferencias en cuanto a la incidencia de la fractura de cadera en función de la localización geográfica<sup>96</sup>, lo cual sugiere una importante implicación de factores genéticos o medioambientales en su patogenia.

Las fracturas de cadera son las fracturas por fragilidad que más discapacidad ocasionan. En torno a un 50% de los individuos con estas fracturas pierden su independencia para la deambulación. Se asocian, además, a un aumento de eventos adversos, como neumonías por broncoaspiración o infecciones del tracto urinario. En un estudio realizado en Estados Unidos, se describió una mortalidad en torno al 10% a los 6 meses de la fractura<sup>97</sup>. Esta mortalidad es mayor en hombres que en mujeres, aumenta con la edad y con la existencia de enfermedades concomitantes.

Resulta más complicado conocer con exactitud la incidencia de las fracturas vertebrales, puesto que en ocasiones son asintomáticas y los pacientes no consultan por ellas. Además, pueden existir discrepancias a la hora de llevar a cabo un diagnóstico radiológico. Se estima que la incidencia de las fracturas de este tipo es 3 veces mayor que la de las fracturas de cadera, aunque solo un tercio de las mismas originan una

consulta médica<sup>98</sup>. Las consecuencias más frecuentes de las fracturas vertebrales son el dolor de columna y la pérdida de altura.

Las fracturas de radio distal presentan un patrón de incidencia diferente al de las fracturas de cadera y vertebrales. Existe un aumento en mujeres blancas tras la menopausia, seguido por una fase de meseta<sup>98</sup>. La incidencia en hombres, sin embargo, es baja y no aumenta en exceso con la edad.

### Etiología

La pérdida de masa ósea es una consecuencia inevitable del envejecimiento. Existe un amplio abanico de trastornos que pueden también producir una pérdida de masa ósea acelerada o precoz. Son las llamadas “osteoporosis secundarias”. Podemos clasificar como osteoporosis secundaria dos tercios de los casos de OP en hombres; a más de la mitad de las mujeres premenopáusicas con OP y un quinto de las mujeres posmenopáusicas con OP<sup>99 100</sup>. En la tabla 2 encontramos un listado de las principales causas de OP secundaria.

<b>Principales causas de OP secundaria</b>	
Trastornos endocrinos	Trastornos de la médula ósea
Acromegalia	Amiloidosis
Insuficiencia suprarrenal	Hemocromatosis
Síndrome de Cushing	Hemofilia
Trastornos alimentarios	Leucemia
Hipertiroidismo	Linfoma
Hiperparatiroidismo	Mastocitosis
Hiperprolactinemia	Mieloma múltiple
Hipogonadismo	Anemia perniciosa
Diabetes mellitus	Sarcoidosis
Hipogonadismo	Talasemia
Tratamientos	Trasplantes de órgano
Corticoides	Médula ósea
Inmunosupresores (ciclosporina)	Órgano sólido (corazón, pulmón, hígado, riñón)

Antiepilépticos (fenobarbital, fenitoína)	Causas gastrointestinales
Inhibidores de la aromatasa	Hepatopatía alcohólica
Heparina	Enfermedad celiaca
Agonistas y antagonistas de la GnRH	Enfermedad inflamatoria intestinal
Algunos quimioterápicos	Síndromes malabsortivos
Trastornos genéticos	Gastrectomía
Hipofosfatasa	Colangitis biliar primaria
Osteogénesis imperfecta	Hepatopatías severas
Homocistinuria	Causas misceláneas (espondilitis anquilosante, artritis reumatoide, enfermedad pulmonar obstructiva crónica)

Tabla 2. Tabla modificada de Fitzpatrick LA. Secondary causes of osteoporosis. Mayo Clin Proc 2002<sup>101</sup>.

Los determinantes principales para la producción de una fractura a cualquier nivel son la fuerza aplicada sobre el hueso y la resistencia de este. Las fracturas osteoporóticas son el resultado de una combinación de disminución de la resistencia del hueso y de un aumento del riesgo de caída.

### 1. Factores que influyen en la resistencia ósea:

Clásicamente, la masa ósea ha acaparado la mayor parte de la atención a la hora de evaluar la resistencia del hueso. Sin embargo, existen además otros factores determinantes de la resistencia del hueso, como la macro y la microarquitectura del hueso y la calidad del tejido<sup>102</sup>.



Figura 9. Principales determinantes de la resistencia ósea.

#### - Masa ósea

La masa ósea de un individuo depende de la masa ganada durante la infancia y la juventud y el consiguiente pico de masa ósea alcanzado en la tercera década de la vida, así como de la velocidad de pérdida posterior. Aunque los factores genéticos son en buena medida determinantes del pico de masa ósea<sup>103</sup>, algunos factores ambientales también pueden tener un fuerte impacto durante las primeras etapas de la vida<sup>104</sup>.

La pérdida de masa ósea se ve habitualmente influida por la edad (y los diversos procesos de envejecimiento) y la caída en los niveles de estrógenos en mujeres post menopáusicas. En algunos casos, se dan además otros factores independientes de la edad, como el hiperparatiroidismo, algunos fármacos como los corticoides o una disminución de las cargas mecánicas que actúan sobre el esqueleto (por ejemplo, en situaciones de inmovilización)<sup>93</sup>.

#### - Macroarquitectura

La macroarquitectura hace referencia al tamaño y la forma (geometría) del hueso. Una de las características geométricas mejor definidas y con mayor asociación con las fracturas es la longitud del eje de la cadera. Cuanto mayor sea este eje, mayor será el riesgo de fractura. Esta asociación es independiente de la DMO y de la edad<sup>105 106 107</sup>. La distribución espacial de la masa ósea es también importante. Por ejemplo, a igualdad de masa, son más resistentes los huesos más anchos (los que tienen la masa distribuida más lejos del eje central), que los más estrechos. Sin embargo, estas relaciones son complejas, porque, por otra parte, si el mayor diámetro del hueso implica que las corticales sean demasiado finas, aumenta el “índice de pandeo” (“buckling ratio”) y en consecuencia la fragilidad cortical<sup>108</sup>.

#### - Microarquitectura

La microarquitectura del hueso también afecta a la resistencia de este. Entre los factores que pueden aumentar el riesgo de fracturas encontramos el aumento de la porosidad del hueso cortical, el adelgazamiento de las trabéculas y la disminución de la conectividad trabecular<sup>109</sup>. Esas alteraciones son consecuencia de modificaciones en los

fenómenos celulares básicos, es decir, en el remodelado. Por ejemplo, el aumento de la resorción es responsable del incremento de la porosidad cortical y de la pérdida de conectividad trabecular, mientras que una actividad osteoformadora insuficiente a nivel de las unidades de remodelado suele ser la causa del adelgazamiento de las trabéculas.

#### - Calidad del hueso

Los factores que influyen en la calidad del hueso son mal conocidos y continúan siendo estudiados. Esta calidad probablemente tenga varios componentes que incluyen la cantidad de colágeno, la polimerización de este y la mineralización de la matriz. Desgraciadamente, la calidad ósea no se puede medir con exactitud en la práctica clínica. Sin embargo, existen estudios preliminares acerca de la utilidad del índice trabecular óseo (Trabecular Bone Score, TBS) y la microindentación que presentan resultados prometedores.

El TBS es una medida que puede obtenerse de la imagen de la DXA. A menudo se identifica como un marcador de “calidad”, pero se relaciona con la microarquitectura trabecular, más bien que como marcador de la calidad intrínseca del tejido óseo. En todo caso, recientemente se ha propuesto como una nueva herramienta para la predicción del riesgo de fractura y para la monitorización del tratamiento<sup>110</sup>.

La microindentación es una técnica pretende medir la calidad intrínseca del tejido. Utiliza un instrumento denominado Osteoprobe. Se basa en la creación de microfracturas para medir la resistencia del hueso a la propagación de dichas fracturas. Será necesario esperar a que futuros estudios avalen su validez de cara a valorar su aplicación en la práctica clínica<sup>111</sup>.

## 2. Factores genéticos que influyen en la masa ósea.

La osteoporosis es una enfermedad compleja cuyo desarrollo depende tanto de factores ambientales como de susceptibilidad genética. Estudios entre familiares han demostrado que existen factores genéticos que juegan un papel importante en la densidad mineral ósea y en la predisposición de fracturas. Por ejemplo, se sabe que las mujeres cuyas madres hayan sufrido una fractura de cadera tienen el doble de riesgo de

presentar una al compararlas con controles<sup>112</sup>. La DMO es el mayor predictor disponible del desarrollo de fracturas osteoporóticas. El pico de DMO alcanzado durante la vida depende en gran medida de factores genéticos estimándose según estudios entre el 40 y el 90%<sup>113 114 115</sup>.

La demostración de la existencia de un componente genético en la OP ha llevado a la realización de estudios genéticos fundamentalmente de dos tipos: estudios en relación con un gen diana (con un papel conocido en el desarrollo de osteoporosis) y estudios de asociación de genoma completo (GWAS, Genome Wide Association Study).

Para los estudios en búsqueda de genes diana se han propuesto numerosos polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo óseo (como el del receptor de la vitamina D, el colágeno tipo I o el receptor estrogénico  $\alpha$ )<sup>116 117 118 119 120</sup>. Se realizó un meta-análisis de 5 poblaciones caucásicas que incluía a más de 19000 pacientes osteoporóticos<sup>121</sup>. Se investigaron 36016 SNPs de 150 loci de genes candidatos y se identificó la asociación de varios SNPs de 9 genes (ESR1, LRP4, LRP5, ITGA1, SOST, SPP1, TNFRSF11A, TNFRSF11B, and TNFSF11) con la DMO. Solo en 4 de ellos (LRP5, SOST, SPP1, and TNFRSF11A) se evidenció además una asociación significativa con el riesgo de fractura.

Por otro lado, los GWAS consisten en un análisis a lo largo de todo el genoma con el fin de identificar una variación genética con un determinado rasgo o una determinada enfermedad. Los GWAS han identificado más de 500 loci con aparentes vínculos con distintos parámetros del hueso<sup>122</sup>. La mayoría de los loci identificadas por los GWAS corresponden a vías del metabolismo óseo ya conocidas. Aunque estos estudios han contribuido a una mejor comprensión del papel de los factores genéticos en el desarrollo de la osteoporosis han reportado típicamente resultados difíciles de reproducir o con falsos negativos y no permiten de momento una estratificación de riesgo de enfermedad en base a sus resultados. 3. Cambios en masa ósea por hormonas sexuales

### Estrógenos

Con la edad se produce una significativa pérdida de masa ósea tanto en hombres como en mujeres<sup>123</sup>. Está demostrado que esta pérdida de masa ósea es más rápida y

acusada en mujeres tras la menopausia. Con la menopausia se produce un descenso en los niveles de estrógenos. Inicialmente, las mujeres postmenopáusicas presentan una fase de unos 10 años de duración con un rápido descenso de la masa ósea con una pérdida aproximada de alrededor del 20-30% del hueso trabecular (presente en vertebras, pelvis y región distal del antebrazo) y entre el 5-10% del hueso cortical (mayor presencia en huesos largos y en forma de fina capa alrededor de las regiones con hueso trabecular)<sup>124</sup>. Tras esta fase inicial, se produce una segunda fase de pérdida lenta pero continua que se extenderá durante el resto de la vida de las mujeres. Durante esta segunda fase presentan una pérdida similar de hueso trabecular y cortical. A lo largo de la segunda mitad de la vida, los hombres presentan una pérdida de masa ósea paulatina y continua similar a la que experimentan las mujeres en esa segunda fase postmenopáusica. Al no presentar la primera fase postmenopáusica que sí experimentan las mujeres, los hombres tienen una pérdida tanto de hueso cortical como trabecular menor que la de las mujeres. Con el avance de la edad se produce un aumento en la incidencia de fracturas vertebrales y de cadera en hombres, aunque el inicio de aparición de estas fracturas tiene un retraso de en torno a 10 años respecto a las mujeres.

Los efectos de los estrógenos sobre el esqueleto se producen mediante diferentes mecanismos.

- Acción sobre los osteoclastos: supresión la producción de RANKL<sup>125</sup>, aumenta la producción de OPG<sup>126</sup>, induce la apoptosis de osteoclastos mediante un descenso en la actividad de c-jun limitando así la transcripción dependiente de la proteína activadora -1 (AP-1)<sup>127</sup>. Induce la apoptosis de osteoclastos de manera indirecta estimulando la producción de TGF beta por parte de los osteoblastos.
- Acción sobre los osteoblastos: Promueven la diferenciación de células mesenquimales hacia osteoblastos, favorecen la diferenciación de preosteoblastos a osteoblastos, limitan la apoptosis de osteoblastos<sup>128</sup>, aumentan la producción por parte de osteoblastos de factores de crecimiento (IGF-1 y TGF  $\beta$ ) y la síntesis de procolágeno. Un estudio sugiere además que inhiben la secreción de esclerostina<sup>129</sup> favoreciendo la activación de la vía Wnt.

- Acción sobre los osteocitos: limitan la apoptosis de osteocitos.
- Acción sobre las células inmunes y sobre la microbiota: una serie de estudios, sobretudo en modelos murinos, han evidenciado un papel importante de los linfocitos T en la pérdida de hueso inducida tras una ovariectomía. Las ovariectomías conllevan un aumento de linfocitos T y un secundario aumento de osteoclastogénesis mediado a través de un aumento de M-CSF y de RANKL<sup>130</sup>. Además, tras una ovariectomía se produce también un aumento de linfocitos B<sup>131</sup> y parece que la deficiencia estrogénica podría aumentar la expresión de RANKL por parte de estas células<sup>125</sup>. Sin embargo, el mecanismo a través del cual esto se produce no está elucidado.

Por otro lado, el descenso de estrógenos conlleva a un aumento de la permeabilidad intestinal y a la expansión de linfocitos activados Th17 generando un aumento de citoquinas osteoclastogénicas (TNF $\alpha$ , RANKL, IL-17)<sup>132</sup>

## Andrógenos

Los andrógenos son también esenciales para el desarrollo del hueso y para el mantenimiento de la masa ósea tanto en hombres como en mujeres. Se sabe que estimulan el crecimiento radial y longitudinal de los huesos aumentando el tamaño del hueso cortical. La testosterona ejerce sus efectos anabólicos a través de la unión al receptor androgénico y mediante la conversión al estrógeno 17-beta estradiol por medio de la acción de la enzima aromatasa.

El envejecimiento en hombres se ve acompañado de una reducción progresiva del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas con el consecuente descenso en los niveles de testosterona. Aunque la testosterona es la hormona sexual predominante en los hombres, se ha visto que su DMO está mejor correlacionada con sus niveles de estógenos<sup>133 134</sup>.

## Factores de riesgo de fracturas

Podemos dividir los factores de riesgo de fractura en dos: óseos (relacionados con las propiedades del hueso) y extraóseos (relacionados con la predisposición a las caídas). Entre los factores relacionados con el hueso, el que tiene un mayor peso a la

hora de evaluar el riesgo de una fractura es el antecedente de una fractura por fragilidad previa. Otros que también influyen son los antecedentes familiares de fractura, la edad, el sexo, la estatura, el peso, el sedentarismo, el consumo de tabaco, enfermedades asociadas o los tratamientos recibidos (como, por ejemplo, los corticoides). Muchos de esos factores influyen en la masa ósea y por tanto se traducen en una disminución de la DMO.

Entre los factores de riesgo extraóseos encontramos una gran variedad de circunstancias que se relacionan con un aumento de riesgo de caídas, como el uso prolongado de fármacos depresores del sistema nervioso central (SNC), consumo de alcohol problema de movilidad, déficits visuales, hipotensión ortostática, deterioro cognitivo y la presencia de elementos de peligro en el ambiente del individuo (alfombras, escaleras...).

### Cribado

La estrategia más recomendable es la búsqueda selectiva de casos. Con ella se pueden detectar casos en los que el médico puede aplicar los diferentes algoritmos de intervención. La confirmación diagnóstica se establecerá por la presencia de fracturas o, en su ausencia, por técnicas densitométricas. A diferencia de Estados Unidos, en Europa no se recomienda el cribado poblacional, por no estar suficientemente demostrado que su relación coste-efectividad sea favorable<sup>135</sup>.

### Tratamiento

#### 1. Intervenciones no farmacológicas

Al igual que en el resto de la población, a los pacientes con osteoporosis definida o en riesgo de desarrollarla se les recomiendan unas medidas generales de promoción de salud. Es aconsejable la realización de actividad física<sup>136</sup> adecuada a las condiciones individuales, el abandono del hábito tabáquico, reducción del consumo de alcohol y una ingesta adecuada de calcio. Se recomienda además promover los programas de prevención de caídas en individuos frágiles.

## Calcio y vitamina D

El calcio es un requerimiento nutricional básico. Con la edad se produce un descenso en la eficacia de la absorción de calcio que podría estar en relación con una pérdida de receptores intestinales de vitamina D, o con una resistencia de estos receptores a la acción de la 1,25-dihidroxitamina D. En mujeres posmenopáusicas se recomienda una ingesta de al menos 1200 mg/día. En caso de que no se consiga alcanzar esta cifra con la dieta, se recomendará la toma de suplementos de calcio<sup>137</sup>.

La ingesta diaria de vitamina D debería rondar las 800 UI<sup>138</sup>. En caso de que esta cifra no se alcanzase, se debería recomendar una suplementación, especialmente en los pacientes con niveles bajos de vitamina D y osteoporosis definida o en riesgo de desarrollo.

## 2. Intervenciones farmacológicas

Los fármacos empleados para el tratamiento de la osteoporosis se dividen en antirresortivos y anabólicos, dependiendo de si su efecto consiste en la inhibición de la resorción ósea o en la estimulación de la formación de hueso. Es preciso matizar que debido al acoplamiento entre la acción de los osteoclastos y la de los osteoblastos, en la mayoría de los casos la inhibición de la resorción ósea inducida por fármacos se ve seguida por una inhibición secundaria de la formación de hueso. En la misma línea, se observa cierto aumento en la resorción de hueso tras un aumento de la formación promovido por agentes anabólicos.

### - Terapia hormonal sustitutiva y SERMs

La relación entre la deficiencia estrogénica y la osteoporosis está bien establecida. Durante años se consideró la administración de estrógenos como el tratamiento de elección para la osteoporosis posmenopáusica. Los estrógenos actúan sobre el hueso a través de mecanismos complejos, como hemos visto. Entre otros efectos, los estrógenos suprimen la formación de los osteoclastos al reducir la expresión de RANKL en las células de la médula ósea y los osteocitos, e incrementan la secreción de OPG por parte de los osteoblastos, lo cual de manera indirecta inactiva a RANK<sup>139</sup>. De

manera que, a través de acciones directas e indirectas, los estrógenos son capaces de producir una inhibición de la resorción y un efecto positivo sobre la masa ósea. Sin embargo, su uso prolongado se asocia con efectos secundarios graves, sobre todo a nivel cardiovascular y sobre el tejido mamario, por lo que no se recomiendan como tratamiento de elección en la OP<sup>140</sup>. Eso sí, el tratamiento con estrógenos para el alivio de síntomas climatéricos en mujeres posmenopáusicas con OP proporcionará protección frente a la pérdida de masa ósea.

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs) constituyen un grupo de fármacos que se unen a los receptores de los estrógenos produciendo una acción agonista o antagonista en función del tejido diana. Estos compuestos, entre los que se encuentra el raloxifeno y el bazedoxifeno, son capaces de reproducir los efectos beneficiosos de los estrógenos sobre la masa ósea, minimizando sus efectos adversos sobre la mama y el endometrio. Los SERMs han demostrado tener un efecto positivo sobre la masa ósea, siendo capaces de aumentar la DMO y de reducir las fracturas vertebrales. Sin embargo, su potencia antirresortiva es limitada y no parece que reduzcan las fracturas de cadera<sup>141 142</sup>.

Otros antirresortivos

- Bifosfonatos

Los bifosfonatos son los fármacos más comúnmente empleados en el tratamiento de la OP. Entre los bifosfonatos más frecuentemente administrados, encontramos el zoledronato que se administra una vez al año por vía intravenosa, y el alendronato y el risedronato, ambos de administración oral.

Los bifosfonatos como los mencionados reducen la actividad de los osteoclastos y promueven su apoptosis mediante la inhibición de la farnesil pirofosfato sintetasa, que es una enzima de la vía del mevalonato<sup>143 144</sup>. Por otro lado, se piensa que estos fármacos tienen además efectos anti-apoptóticos sobre los osteoblastos y osteocitos mediante un mecanismo que incluye la fosforilación de quinasas<sup>145</sup>. Sin embargo, el efecto global implica una reducción de la formación ósea, secundaria a su efecto antirresortivo, y mediada por el acoplamiento entre las dos fases del remodelado óseo.

Estos fármacos se asocian con un aumento de la DMO y una disminución del riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales<sup>141 146 147 148</sup>.

A pesar de que los bifosfonatos son fármacos con un buen perfil de seguridad, y generalmente bien tolerados, no están exentos de efectos adversos. Además de algunos peculiares, como las fracturas femorales atípicas y la osteonecrosis maxilar (que se comentaran con más detalle más adelante), se algunos pacientes sufren otras reacciones desfavorables. Se ha descrito toxicidad gastrointestinal asociada con los bifosfonatos orales<sup>149</sup>, síndrome pseudogripal con zoledronato y en un estudio<sup>148</sup> se describió una asociación con un aumento de incidencia de fibrilación auricular, aunque esto no se reprodujo en un segundo estudio<sup>150</sup>. La vía de eliminación de los bifosfonatos es la renal, de manera que el uso de estos fármacos está contraindicado en caso de deterioro severo de la función renal.

#### - Denosumab

El Denosumab es un anticuerpo monoclonal con una alta afinidad por el RANKL. Al unirse al RANKL mimetiza la acción de la OPG impidiendo la interacción RANK-RANKL, bloqueando así la actividad osteoclástica e inhibiendo la resorción del hueso. La administración de este fármaco es por vía subcutánea cada 6 meses. Al contrario que los bifosfonatos, que inhiben la actividad de osteoclastos maduros, el denosumab previene la proliferación y maduración de preosteoclastos.

El denosumab tiene un potente efecto antirresortivo, aumenta la DMO y reduce el riesgo de fracturas, tanto vertebrales como no vertebrales<sup>151</sup>.

El estudio FREEDOM es el que proporciona hasta el momento la mayor información acerca del perfil de seguridad del denosumab. La incidencia de infecciones, procesos neoplásicos o eventos cardiovasculares fue similar entre aquellos pacientes que recibieron denosumab y los que recibieron placebo. Cabe mencionar que una de las mayores preocupaciones acerca del tratamiento con denosumab es el efecto rebote en DMO y en incidencia de fracturas vertebrales tras su suspensión<sup>152</sup>. Para evitar este indeseado efecto se recomienda la administración de bifosfonatos tras la suspensión del denosumab<sup>153</sup>.

## Efectos adversos de fármacos antirresortivos

Algunos pacientes pueden ocasionalmente presentar complicaciones peculiares con el tratamiento antirresortivo como las fracturas femorales atípicas (FFA) y la osteonecrosis maxilar (ONM). Estas complicaciones son relativamente raras, pero son potencialmente graves y de manejo complicado por lo que el conocimiento de las mismas se ha asociado con una disminución en la prescripción de estos fármacos y con un menor cumplimiento terapéutico.

### Fracturas femorales atípicas (FFA)

La ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) ha elaborado unos criterios para identificar las fracturas atípicas, que incluyen una localización subtrocantérea o diafisaria, un trayecto transversal o levemente oblicuo, una conminación mínima o ausente, un engrosamiento perióstico en la cortical externa y la ausencia de traumatismo de alto impacto desencadenante<sup>154</sup>.

Aunque la patogenia de las FFAs aún no está completamente esclarecida, se sabe que la inhibición del remodelado óseo puede impedir la reparación de fracturas de estrés incompletas resultando finalmente en fracturas completas. Las FFA se han relacionado sobretodo con el tratamiento con bifosfonatos<sup>155 156 157</sup> pero también se han comunicado casos asociados a otros fármacos como el denosumab<sup>158</sup>.

Los estudios publicados acerca de FFAs sugieren que existe una susceptibilidad individual determinada, al menos en parte, por factores genéticos que, aunque aún no se han identificado con seguridad, probablemente sean de tipo poligénico.<sup>102 159 160 161 162 163</sup>

La frecuencia de las FFA varía notablemente de unos estudios a otros. Las estimaciones oscilan entre 3 y 50 casos por cada 100 000 pacientes-año de tratamiento con bifosfonatos. El tratamiento prolongado, durante más de 5 años, parece asociarse a un aumento de riesgo, llegando la incidencia en esos casos a unos 130 casos por 100 000 pacientes-año<sup>164</sup>.

## Osteonecrosis maxilar (ONM)

Hasta el año 2000, la mayor parte de los casos de ONM se observaban en pacientes con tumores de cabeza y cuello que recibían tratamiento con radioterapia<sup>165</sup>. A principios de los 2000 se comenzaron a describir lesiones similares en pacientes sin antecedentes de exposición a radioterapia, pero que sí que habían recibido altas dosis de bifosfonatos en el contexto de tratamientos oncológicos, lo cual llevó a plantear la asociación entre el uso estos fármacos y el desarrollo de ONM<sup>166</sup>.

En el año 2007 se establecieron los criterios diagnósticos para la ONM relacionada con bifosfonatos: 1) exposición de hueso en la región mandibular/maxilar que persiste durante al menos 8 semanas, 2) tratamiento con bifosfonatos y 3) ausencia de antecedentes de radioterapia en la región craneocervical<sup>167</sup>.

La ONM se puede manifestar como dolor, tumefacción, eritema y pérdida de piezas dentarias. Es posible que estos pacientes desarrollen además otras complicaciones, como sinusitis, abscesos o fistulas extraorales. Las lesiones propias de la ONM se producen con mayor frecuencia en la mandíbula que en el maxilar (ratio 2:1).

Se estima una incidencia de 1-90 casos por cada 100 000 pacientes expuestos a bifosfonatos y año<sup>168</sup>. La mayor parte de estos casos se producen en pacientes que han recibido altas dosis de bifosfonatos (especialmente zoledronato y pamidronato) por procesos oncológicos (normalmente neoplasias mamarias y mieloma múltiple). En torno al 95% de los casos aparecen en pacientes tratados con bifosfonatos intravenosos, mientras que solo el 5% restante se asocian a bifosfonatos orales<sup>169</sup>. Parece que la incidencia aumenta además con la duración del tratamiento<sup>167 170 171</sup>.

Se han descrito también casos de ONM en pacientes en tratamiento con otros fármacos, como el denosumab y los inhibidores de la angiogénesis, aunque el riesgo parece menor que el asociado a los bifosfonatos<sup>172</sup>.

El desarrollo de ONM parece ser el resultado de una combinación de predisposición individual (con una probable influencia genética<sup>173 174</sup>) y de factores de riesgo externos. Además del tratamiento con bifosfonatos, se considera que otros

factores pueden aumentar el riesgo de ONM, como el tratamiento concomitante con con talidomida o glucocorticoides, la radioterapia, la edad avanzada, la diabetes, la obesidad, el tabaquismo o la mala higiene dental<sup>175 176</sup>.

### Osteoformadores

Como ya hemos descrito, los fármacos antirresortivos inhiben la actividad de los osteoclastos, pero debido al mecanismo de acoplamiento, de manera secundaria también inhiben la actividad de los osteoblastos. Esto limita el incremento en DMO con el tratamiento antirresortivo. Interesaría, por tanto, en pacientes con una masa ósea muy reducida o con fracturas recurrentes, el tratamiento con fármacos osteoformadores<sup>177</sup>.

Como ya hemos comentado, el remodelado óseo es el proceso coordinado mediante el cual se repara y renueva el esqueleto y consiste en la resorción de hueso viejo por parte de los osteoclastos y la formación posterior de hueso nuevo por parte de los osteoblastos. Los fármacos anabólicos pueden actuar estimulando la formación ósea relacionada con el remodelado, la relacionada con el modelado, o ambas. Entre los anabólicos disponibles actualmente, el romosozumab parece tener un mayor efecto sobre el modelado que la PTH <sup>178</sup>.

El efecto estimulador de la formación ósea con tratamientos osteoformadores tiende a atenuarse con el tiempo, sobre todo en el caso del romosozumab, de manera que solo se recomienda la administración de estos fármacos durante un periodo corto de tiempo (1-2 años). Para mantener el aumento de DMO se recomienda iniciar un tratamiento con antirresortivos tras la suspensión del osteoformador.

### Análogos de la hormona paratiroidea (PTH)

La teriparatida y la abaloparatida son dos análogos de la PTH. La teriparatida es un análogo recombinante de la PTH intacta que contiene los primeros 34 aminoácidos de la PTH, mientras que la abaloparatida es un agonista sintético del receptor 1 de la PTH (PTH1R), que contiene la secuencia de la aminoterminal de la PTHrp (péptido relacionado con la PTH), parcialmente modificada. La respuesta a este estímulo depende

la naturaleza del mismo, ya que se sabe que una activación mantenida incrementa la resorción ósea, mientras que un estímulo intermitente aumenta la formación ósea<sup>179</sup>. Los análogos de la PTH son los fármacos anabólicos más empleado hasta el momento actual y se administran diariamente por vía subcutánea.

Mediante administraciones intermitentes (diarias) este tratamiento es capaz de estimular la formación de hueso,<sup>180 181 182</sup> aunque de manera secundaria induce un aumento en la resorción ósea. Esta resorción parece ser menor con la abaloparatida que con la teriparatida<sup>183</sup>.a través de mecanismos que no han sido completamente elucidados.

Ambos fármacos han demostrado reducir el riesgo de fracturas vertebrales y aumentar la DMO a nivel de la columna vertebral al compararlos con placebo<sup>181 184 185</sup> y, en el caso de la teriparatida, también frente a risedronato<sup>186</sup>.

Por razones de coste y forma de administración, estos agentes anabólicos no se consideran como terapia inicial en la mayor parte de los pacientes con OP. Su utilización está indicada en casos de OP severa, como los pacientes con fracturas vertebrales múltiples.

Algunos de los efectos secundarios descritos en relación a estos fármacos son cefalea, náuseas, mareos, hipercalcemia<sup>181</sup>, hipomagnesemia y niveles bajos de vitamina D<sup>186</sup>. En un estudio preclínico se observó un aumento de la incidencia de osteosarcomas en ratas recibiendo teriparatida<sup>187</sup> y en otro con abaloparatida<sup>188</sup>. Aunque esto no se reprodujo en estudios posteriores<sup>189 190 191</sup>. se ha limitado el uso de teriparatida a un periodo de 18-24 meses y a 18 meses el uso de abaloparatida.

## Romozumab

El romozumab es un agente anabólico aprobado por la FDA (US Food and Drug Administration) y la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) en 2019.

Se trata de un anticuerpo monoclonal anti- esclerostina<sup>192</sup>. Este fármaco tiene un efecto dual y es capaz de manera simultánea de fomentar la formación y de inhibir la

resorción de hueso. Se ha demostrado que, a través de esta inhibición de la esclerostina, el romosozumab produce un aumento de la DMO al compararlo frente a placebo, alendronato y teriparatida<sup>193</sup>, a nivel de columna lumbar y cadera <sup>194</sup> y reduce el riesgo de fracturas vertebrales<sup>195</sup> y no vertebrales<sup>196</sup> en comparación con placebo y alendronato.

La principal preocupación en relación con los efectos secundarios de este fármaco es la posibilidad de reacciones adversas severas desde el <sup>195</sup>punto de vista cardiovascular descritas en un estudio. Serán precisos nuevos estudios para elucidar este aspecto.

El estímulo de la formación de hueso y la ganancia de masa ósea revierten tras la suspensión del tratamiento con romosozumab. Por ello, debería seguirse de un fármaco antiresortivo<sup>197</sup>.

## **Artrosis**

### Definición

La artrosis (OA) es la enfermedad articular más frecuente <sup>198</sup>. Clínicamente, se trata de un trastorno de instauración progresiva, caracterizado por la existencia de dolor articular, junto con grados variables de limitación funcional. Cualquier articulación puede desarrollar artrosis, pero las más comúnmente afectadas son las pequeñas articulaciones de las manos y aquellas articulaciones que soportan el peso del cuerpo, como las rodillas y las caderas.

La artrosis puede definirse clínica, radiográfica o anatomopatológicamente. En la tabla 3 se encuentran los criterios elaborados por el American College of Rheumatology<sup>199 200 201</sup> (Tabla). Para la mano se usan únicamente criterios clínicos, mientras que en la cadera y la rodilla proponen tanto criterios clínicos como radiológicos. Debido a su alta especificidad (98, 91 y 91% para mano, rodilla y cadera respectivamente) estos son los criterios más útiles para distinguir la OA de otras patologías.

<b>Criterios clínicos y radiológicos de artrosis del American College of Rheumatology</b>
<b>Mano</b> <sup>200</sup> Para el diagnóstico es necesario 1-3 y 4 ó 5
1. Dolor, molestias o rigidez en la mano la mayoría de los días del mes anterior.
2. Prominencia de tejido duro en $\geq 2$ de 10 articulaciones seleccionadas*.
3. Menos de 3 articulaciones de MCF tumefactas.
4. Aumento de volumen de tejido duro en $\geq$ IFD.
5. Deformidad de $\geq$ de 2 de 10 articulaciones seleccionadas.
<b>Rodilla: clínicos</b> <sup>201</sup> Para el diagnóstico es necesario 1+2+4 ó 1+2+3+5 ó 1+4+5
1. Dolor en la rodilla la mayoría de los días del mes anterior.
2. Crepitación con la movilidad articular activa.
3. Rigidez matutina $\leq 30$ minutos.
4. Prominencia ósea de la rodilla en la exploración.
5. Edad $\geq 38$ años.
<b>Rodilla: clínicos y radiográficos</b> <sup>201</sup> Para el diagnóstico es necesario 1+2+3 ó 1+2+4 ó 1+3+4
1. Dolor en la rodilla la mayoría de los días del mes anterior.
2. Osteofitos en los márgenes articulares.
3. Líquido sinovial característico de la artrosis.
4. Edad $\geq 40$ años.
5. Rigidez matutina $\leq 30$ minutos.
6. Crepitación con la movilidad articular active.
<b>Cadera: clínicos y radiográficos</b> *1 Para el diagnóstico es necesario 1+2+3 ó 1+2+4 ó 1+3+4
1. Dolor en la cadera la mayoría de los días del mes anterior.
2. VSG $\leq 20$ mm/h
3. Osteofitos radiográficos femorales y/o acetabulares
4. Pinzamiento radiográfico del espacio articular de la cadera.

Tabla 3. Tabla modificada de Altman R et al<sup>201 199 200</sup>. \* 10 articulaciones seleccionadas: 2-3 IFD, 2-3 IFP y 1 CMC bilateral. CMC carpometacarpiana, IFD interfalángica distal, IFP interfalángica proximal, MCF metacarpofalángica, VSG velocidad de sedimentación globular.

### Etiología y factores de riesgo

Podemos dividir los factores de riesgo para el desarrollo de OA entre aquellos que predisponen al individuo y aquellos que predisponen la articulación<sup>202</sup>.

Entre los que predisponen al individuo encontramos factores no modificables como la edad, el sexo, la genética o la etnia y otros modificables como la obesidad o la dieta.

Existen por otro lado factores que convierten la articulación en más susceptible para el desarrollo de la OA, como el tipo de actividad física, la musculatura, la alineación de la articulación o los traumatismos y otras lesiones.

### Epidemiología

Resulta difícil calcular con exactitud la incidencia y prevalencia de la OA, ya que el síndrome clínico no siempre acompaña a los cambios estructurales propios de la OA (evidenciados normalmente mediante técnicas de imagen). El estudio de Framingham reveló que un 6.8% de los adultos presentan hallazgos radiográficos en la mano compatibles con OA. De estos, se estima que en torno al 26% de las mujeres y el 13% de los hombres presentan sintomatología acompañante<sup>203</sup>. Se describió además que en torno al 19% de los adultos presentan hallazgos radiográficos sugestivos de OA de rodilla, siendo un 17% de los casos sintomáticos<sup>204</sup>. La prevalencia de la OA aumenta con la edad. Sin embargo, la OA no es una consecuencia inevitable del envejecimiento.

### Fisiopatología

En el pasado se consideraba que la OA era un trastorno puramente degenerativo. Sin embargo, con el tiempo se ha comprobado que se trata de un proceso más complejo de lo que se creía<sup>205</sup>. La patogenia de la OA se basa fundamentalmente en la degradación progresiva del cartílago articular, el engrosamiento del hueso subcondral, la formación

de osteofitos, la degradación ligamentosa y grados variables de inflamación de la cápsula sinovial<sup>206</sup>.

Los hallazgos fisiopatológicos encontrados en pacientes con OA sugieren que esta enfermedad se produce como una respuesta de la articulación a una variedad de insultos.

Los factores biomecánicos provocan alteraciones químicas en la articulación que favorecen la degradación del cartílago. Inicialmente se producen una serie de cambios anabólicos que se caracterizan por la proliferación de los condrocitos y un aumento de la producción de matriz. Esta fase inicial va seguida de un estado predominantemente catabólico, caracterizado por disminución de la síntesis de matriz, aumento de la degradación proteolítica de la matriz y apoptosis de los condrocitos. La degradación del cartílago se perpetúa por la liberación de mediadores inflamatorios por parte de la membrana sinovial y de los condrocitos<sup>207</sup>.

La degradación del cartílago se perpetúa por la liberación de mediadores inflamatorios por parte de la membrana sinovial y de los condrocitos. La lista de mediadores proinflamatorios encontrados en el líquido sinovial de pacientes con OA continúa en aumento e incluye citoquinas como la IL-1, la IL-6 o el TNF alfa<sup>208</sup>.

### Manifestaciones clínicas

El principal síntoma referido por los pacientes con OA es el dolor articular. Es un dolor de características mecánicas que se exagera con el uso de la articulación y que mejora con el reposo<sup>209</sup>. Los pacientes con OA pueden referir además otros síntomas como: tumefacción articular, limitación funcional, inestabilidad de la marcha y deformidad articular (son típicos los nódulos de Heberden y Bouchard en las articulaciones de las manos).

### Diagnóstico

El diagnóstico de la OA se basa en la clínica del paciente y no suele ser necesaria la realización de pruebas complementarias. Sin embargo, en casos de diagnóstico

incierto se puede hacer uso de técnicas de imagen. El principal objetivo en caso de la realización de estas consiste en descartar un diagnóstico alternativo que pudiese ser subsidiario de recibir un tratamiento curativo.

- Pruebas de imagen

- La radiografía convencional es la prueba de imagen más frecuentemente empleada. Permite detectar hallazgos característicos de la OA, como la presencia de osteofitos, el estrechamiento del espacio interarticular o la existencia de esclerosis subcondral o de quistes<sup>210</sup>. Dichos hallazgos radiológicos son poco sensibles, sobre todo en las fases iniciales de la enfermedad.

- Aunque en general no resulta necesario realizar una resonancia magnética (RMN), en ocasiones esta puede ser de utilidad, ya que permite identificar estadios precoces de la enfermedad en los que aún no se observan cambios en la radiografía simple. A diferencia de la radiografía simple, permite ver todos los tejidos articulares, incluyendo los cartílagos, meniscos, ligamentos, tendones, membrana sinovial y médula ósea.

- La ecografía puede resultar útil para la evaluación de patología sinovial.

Los cambios radiológicos aumentan conforme el individuo envejece<sup>211</sup>. Estos cambios no siempre tienen correlación con un empeoramiento en la sintomatología<sup>212</sup>.

### Tratamiento

El tratamiento disponible en la actualidad para la OA es puramente sintomático, ya que no disponemos de fármacos modificadores de la enfermedad para este trastorno. Las recomendaciones varían en función de la severidad de los síntomas: 1) en los casos más leves, tratamiento conservador no farmacológico basado en ejercicio adaptado y pérdida de peso; 2) en casos leves, fisioterapia a la que se le podría añadir analgesia simple con paracetamol; 3) en casos severos se puede plantear un manejo farmacológico más agresivo con antiinflamatorios no esteroides (AINEs), opioides o tratamientos intraarticulares (corticoides o ácido hialurónico); 4) estadios finales de OA, cirugía (osteotomía o reemplazo de la articulación por una prótesis)<sup>213</sup>.

Existen numerosos fármacos que se han planteado como posible tratamiento para la artrosis en estudio. Algunos de estos fármacos están dirigidos a mejorar el control del dolor como es el caso del Tanezumab (anticuerpo monoclonal anti nerve growth factor)<sup>214</sup> mientras que otros buscan una modificación estructural. Aquellos agentes que tienen como objetivo una modificación estructural, pueden dividirse entre 1) los que actúan sobre vías inflamatorias entre los que se encuentran los inhibidores de TNF  $\alpha$  (Infliximab<sup>215</sup>, Adalimumab<sup>216 217</sup>) y los inhibidores de IL-1. 2) Los que actúan sobre el catabolismo/anabolismo del cartílago como el factor de crecimiento fibroblástico 18, los inhibidores de catepsina K o los inhibidores de la vía Wnt. 3) Los que actúan sobre el remodelado óseo: calcitonina y bifosfonatos.

## **EPIGENÉTICA**

Cada célula de un mismo organismo contiene exactamente la misma secuencia genética. A pesar de compartir unos genes idénticos, las distintas células se comportan de una manera muy diferente. La explicación a estas diferencias no puede encontrarse en la secuencia genética en sí, sino en cambios epigenéticos. Los cambios epigenéticos son cambios transmisibles que pueden alterar la expresión de los genes sin modificar la secuencia genética contribuyendo de esta manera a la diferenciación celular, así como en la adaptación al entorno<sup>218</sup>. Los mecanismos epigenéticos mejor conocidos son las modificaciones de histonas, la metilación del ADN y los RNAs no codificantes (ncRNA). Estos mecanismos regulan la expresión génica al controlar el ensamblaje de la cromatina y la transcripción, o de manera post-transcripcional en el caso de los ncRNAs, controlando la traducción de proteínas.

### **1. Modificaciones de histonas**

La cromatina es una estructura compleja compuesta por DNA, RNA y proteínas que facilitan el empaquetamiento eficiente del DNA en las células. La estructura primaria de la cromatina es el nucleosoma, que consiste en DNA de doble cadena enrollado alrededor de unas proteínas llamadas histonas.

El grado de compactación de la cromatina determina si una determinada secuencia de DNA se encuentra o no disponible para que se una un factor de transcripción específico. La forma de cromatina menos condensada

(eucromatina) facilita el acceso de los factores de transcripción al DNA, posibilitando la transcripción. Sin embargo, la cromatina que muestra un mayor grado de compactación (heterocromatina) impide el acceso de los factores de transcripción y, en consecuencia, bloquea la transcripción.

Esta conformación de cromatina puede verse alterada mediante diversas modificaciones químicas post-traduccionales de las histonas que incluyen la acetilación y la fosforilación (que se asocian con una activación transcripcional) y la metilación y la ubiquitilación (que se asocian con una represión transcripcional)<sup>219</sup>. Existen varias enzimas involucradas en estos procesos, pero las mejor conocidas son las acetiltransferasas (HAT, acetilan las histonas y activan la expresión del gen) y las deacetilasas (HDAC, deacetilan las lisinas de las histonas, silenciando así la expresión del gen). Algunas de estas modificaciones se asocian con una represión de la expresión genética mientras que otras con un aumento.

## 2. Metilación del DNA

La metilación del DNA consiste en la introducción de un grupo metilo en la posición 5' de la citosina del DNA. La metilación ocurre principalmente en los sitios CpG que están distribuidos a lo largo del genoma. En general, la metilación de CpGs en regiones promotoras de genes se asocia con la represión de la expresión de un gen, aunque esto no es constante, ya que la metilación de regiones enhancer puede conllevar consecuencias inhibitoras o estimuladoras. En 2013, Delgado-Calle et al, de nuestro grupo de investigación, publicaron el primer análisis de barrido de la metilación de todo el genoma en muestras de hueso trabecular de biopsias de pacientes con fractura osteoporótica de cadera y controles con OA. Se identificaron 241 sitios CpG en 228 genes con diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la metilación en ambos grupos<sup>220</sup>. En 2017, nuestro grupo analizó el metiloma de MSCs y del Real A et al<sup>221</sup> encontraron diferencias en la metilación de regiones enhancer asociados a genes relacionados con la diferenciación osteoblástica. Estos datos indican que, al igual que ocurre en otros tejidos, los mecanismos epigenéticos, y en particular la metilación de DNA, están involucrados en en la diferenciación de las MSCs.

## 3. RNAs no codificantes

Podemos dividir los RNAs no codificantes en pequeños (“small”; <200 nucleótidos) o largos (“long”, lncRNA, >200 nucleótidos). Los microRNAs (miRNAs, 18 a 25 nucleótidos) constituyen los RNA pequeños no codificantes mejor conocidos. Estos miRNA pueden inhibir la síntesis proteica al unirse a la región 3’ del mRNA diana. Los lncRNAs modulan la actividad de genes mediante una variedad de mecanismos. Por ejemplo, pueden servir como el andamiaje para factores de transcripción u otras moléculas relacionadas con el inicio del proceso de transcripción, o pueden activar algunos modificadores de la cromatina<sup>222</sup>. Diversos estudios han identificado miRNAs que regulan los genes implicados en la osteogénesis. La mayoría de los miRNAs estudiados parecen favorecer la adipogénesis e inhibir la osteogénesis mediante la inhibición de Runx2 u Osx<sup>223 224 225</sup>.

## **ENVEJECIMIENTO Y SENESCENCIA CELULAR**

### Mecanismos bioquímicos implicados en el envejecimiento

El envejecimiento puede definirse como el deterioro funcional tiempo-dependiente que afecta a todos los organismos vivos. Se considera que la causa de este deterioro es un acúmulo progresivo de daño celular que conlleva una pérdida gradual de los mecanismos homeostáticos que mantienen la estructura y la función de los tejidos adultos.

Se han descrito diferentes mecanismos celulares y moleculares que parecen contribuir al envejecimiento<sup>226</sup>:

- Inestabilidad genómica.

El acúmulo de daño genético es un factor fundamental en el desarrollo del envejecimiento. De hecho, existen enfermedades asociadas a un envejecimiento prematuro debido a un acúmulo de daño en el ADN<sup>227</sup>. Agentes exógenos y endógenos pueden desencadenar diversos tipos de lesiones en el ADN. Un daño excesivo sobre el ADN o una reparación insuficiente de las lesiones pueden favorecer el envejecimiento.

- Acortamiento de los telómeros.

El envejecimiento normal se acompaña de un desgaste a nivel de los telómeros. Se ha visto que la disfunción patológica de los telómeros es capaz de acelerar el proceso de envejecimiento en humanos y modelos animales<sup>228</sup>.

- Cambios epigenéticos.

Ya hemos comentado que los cambios epigenéticos son cambios transmisibles que pueden alterar la expresión de los genes sin modificar la secuencia genética y que pueden contribuir a procesos como la adaptación al entorno o la diferenciación celular. Parece ser que ciertos cambios epigenéticos son capaces de provocar el desarrollo de síndromes progeroides en modelos experimentales y se ha propuesto que pudieran tener implicaciones terapéuticas en enfermedades relacionadas con el envejecimiento<sup>229 230</sup>. Los cambios epigenéticos juegan un papel tanto en la respuesta al proceso del envejecimiento como en el desarrollo de este<sup>231</sup>.

- Pérdida de la proteostasis

La homeostasis proteica o proteostasis se mantiene por unos complejos mecanismos que controlan la síntesis de las proteínas, su plegamiento, tráfico, agregación, desagregación y degradación. Las chaperonas moleculares y los sistemas proteolíticos son los responsables del control de calidad al asegurarse de que se produzca una renovación constante de las proteínas intracelulares. Cuando se produce un daño proteico, la acción coordinada de estos sistemas de vigilancia permite detectar y reparar o eliminar las proteínas intracelulares dañadas. El envejecimiento normal y algunas enfermedades asociadas a un envejecimiento precoz están vinculados con alteraciones en la proteostasis como la disfunción de los mecanismos de control de calidad y el acúmulo intracelular de proteínas dañadas<sup>232 233</sup>.

- Cambios metabólicos

El proceso del envejecimiento se caracteriza desde el punto de vista metabólico por un aumento de resistencia a la insulina, modificaciones en la composición corporal y descensos fisiológicos en los niveles de la hormona del crecimiento, del factor de crecimiento insulínico tipo 1 y de las hormonas sexuales<sup>234</sup>. Se ha visto que los polimorfismos genéticos o las mutaciones que reducen la función de la hormona del crecimiento o del factor de crecimiento

insulínico tipo 1 se asocian con mayor longevidad tanto en modelos animales como en humanos. Se ha evidenciado además que la restricción calórica sin desnutrición contribuye a retrasar el desarrollo del fenotipo del envejecimiento<sup>235</sup>.

- Disfunción mitocondrial

Con el paso del tiempo, tiende a disminuir la eficacia de la cadena respiratoria de manera que parece existir una relación entre el envejecimiento y la disfunción mitocondrial.

- Agotamiento de las células madre

Durante el envejecimiento se produce una disminución en el potencial regenerativo de los tejidos. Existen diversos factores que parecen influir en este agotamiento de las células madre. Entre dichos factores encontramos el agotamiento de los telómeros<sup>236</sup>, el acúmulo de ADN dañado<sup>237</sup> o la sobreexpresión de proteínas inhibidoras del ciclo celular como la p16<sup>INK4a</sup><sup>238</sup>.

- Senescencia celular.

### Senescencia celular

La senescencia celular es un estado inducido por diversos tipos de estrés (como insultos metabólicos u oncogénicos) en el que la célula se mantiene metabólicamente activa mientras sufre una parada irreversible en el ciclo celular. Esto se acompaña de una serie de cambios fenotípicos característicos como el aumento en la expresión de p16<sup>INK4a</sup> y p21<sup>Cip1</sup> (aumento de p53) o la inducción de un secretoma pro-inflamatorio denominado fenotipo secretor asociado a la senescencia (senescence associated secretory phenotype, SASP)<sup>239</sup>.

En los organismos jóvenes, la senescencia celular previene de la proliferación de células dañadas lo cual contribuye a la homeostasis tisular y a prevenir el desarrollo de neoplasias. Este “checkpoint” celular requiere una capacidad eficiente de reemplazo de las células senescentes para poder cumplir con el objetivo de deshacerse de tejidos dañados y de las células potencialmente oncogénicas. Con el envejecimiento se produce un acúmulo de células senescentes que probablemente es fruto de una capacidad ineficiente para eliminarlas y de la resistencia de dichas células a la apoptosis. Esto

puede contribuir al desarrollo de patologías relacionadas con el envejecimiento incluyendo la osteoporosis.

### Senescencia y osteoporosis

Algunos estudios en modelos murinos han demostrado que, con el envejecimiento, al menos una parte de las células de diferentes linajes en la médula ósea y en el hueso se vuelven senescentes<sup>240 241</sup>. Al comparar biopsias de huesos de mujeres jóvenes y postmenopáusicas hubo hallazgos similares, poniendo de manifiesto que existen células senescentes en el momento y el lugar de la pérdida ósea relacionada con la edad. Se han llevado a cabo diversos estudios para tratar de elucidar si la presencia de estas células senescentes juega un papel en el desarrollo de la osteoporosis. La administración de senolíticos dirigidos a disminuir las células senescentes en modelos animales se ha asociado con una disminución de la resorción ósea, mientras la formación ósea se mantenía estable o en aumento<sup>240 242 243</sup>.

### **MSCs, ENVEJECIMIENTO y OSTEOPOROSIS**

#### - MSCs y envejecimiento (efecto de la edad sobre las MSCs)

El envejecimiento es un proceso gradual en el que se va produciendo un deterioro de la homeostasis. Esto lleva a un deterioro de las funciones de órganos y tejidos secundario a un daño celular que se va acumulando a lo largo de la vida. El tejido óseo no es ajeno a este proceso y la pérdida de masa ósea se estima que comienza en la tercera década de la vida. Se cree que este envejecimiento óseo no es solo secundario a un aumento de la resorción, sino también a una disminución en la capacidad de auto-renovación de las MSCs<sup>244 245</sup>. Esto conlleva un aumento de adipogénesis a expensas de un descenso de la osteogénesis <sup>246</sup>.

Existen diferentes mecanismos que contribuyen a este cambio en la capacidad de diferenciación de las MSCs con el envejecimiento<sup>247</sup>. Los cambios epigenéticos <sup>248 249</sup><sup>250 251</sup>, el daño del DNA y el desgaste de los telómeros contribuyen al envejecimiento de las MSCs al producir una disminución en la capacidad de auto-renovación, alteraciones funcionales y un descenso en la autofagia. La autofagia resulta un mecanismo básico

para degradar componentes celulares disfuncionantes. La autofagia parece disminuir en MSCs envejecidas. Parece que una estimulación farmacológica de la autofagia a través del uso de un inhibidor de mTOR mejora la capacidad osteogénica de MSCs in vitro<sup>252</sup>.

Se ha sugerido que durante el desarrollo de la OP, las MSCs de la médula ósea exhiben una capacidad disminuida para diferenciarse hacia osteoblastos mientras que aumenta su diferenciación hacia adipocitos<sup>253</sup>. Sin embargo, esto no se ha demostrado de manera consistente en otros estudios.

#### -MSCs y fármacos anabólicos

Como ya hemos comentado previamente, la administración intermitente de PTH tiene un efecto anabólico sobre el hueso. Los estudios histológicos han demostrado que este aumento de la formación ósea se debe en gran parte a un aumento en el número de osteoblastos<sup>254</sup>. Parece que la administración intermitente del anabólico teriparatida aumenta la diferenciación de las MSCs hacia osteoblastos, inhibe la diferenciación hacia adipocitos, promueve la maduración de precursores osteoblásticos<sup>255</sup>, convierte las células de revestimiento en osteoblastos<sup>256</sup> y disminuye la apoptosis de los osteoblastos maduros<sup>254</sup>.

#### Aplicaciones terapéuticas de las MSCs

A lo largo de los últimos años, las MSCs se han propuesto como células a utilizar en terapias regenerativas, pues presentan una serie de características biológicas favorables. En primer lugar, las MSCs pueden ser fácilmente aisladas y cultivadas in vitro, manteniendo una estabilidad genética<sup>257</sup>. En condiciones de cultivo óptimas, las MSCs se pueden mantener durante más de 20 ciclos replicativos y expandidas  $10^9$  veces<sup>258</sup>. En segundo lugar, como ya hemos mencionado, las MSCs son hipo-inmunogénicas, lo cual podría facilitar, en caso necesario, un trasplante alogénico, ya que expresan niveles intermedios del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y bajos de clase II, pero no expresan moléculas coestimuladoras<sup>259</sup>. Tercero, parece que las MSC administradas de manera sistémica son capaces de dirigirse de manera preferente a los tejidos dañados donde son requeridas<sup>260</sup>, pues en ellos se liberan quimiocinas, como el SDF-1 (Stromal cell derived factor 1, que se une a receptores CXCR4, C-X-C motif

chemokine receptor 4 expresados en la superficie de las MSCs<sup>261</sup>. Parece, además, que las MSCs poseen capacidad inmunomoduladora, favorecen la angiogénesis y la liberación de citocinas y de factores anti apoptóticos.

Como desventaja, las MSCs obtenidas de tejidos adultos muestran una menor capacidad de autorrenovación que las células embrionarias<sup>262</sup> y su capacidad de diferenciación está más restringida. Sin embargo, las ESCs (Embryonic stem cells, células madre embrionarias) presentan cierta predisposición a la formación de teratomas, incluso tras inducirse su diferenciación antes del implante. Esto parece ser debido a la existencia de poblaciones celulares residuales indiferenciadas<sup>263</sup>. Se sabe que las ESCs presentan inestabilidad genómica, mientras que existen escasos casos descritos de transformación oncogénica tras el uso de MSCs y estos casos se suelen asociar con un largo periodo de cultivo<sup>264 265</sup>.

Existen diferentes posibilidades de administración de las MSCs. Inicialmente, eran trasplantadas directamente en el lugar de interés. Posteriormente, se desarrollaron estrategias utilizando partículas con una función de andamiaje<sup>266</sup>. De hecho, la ingeniería de tejidos basada en células pluripotenciales se basa en el aislamiento de MSCs, su cultivo in vitro y la siembra de las células en un andamiaje ("scaffold") tridimensional poroso<sup>267</sup>. Existen diferentes tipos de partículas que se pueden utilizar para este andamiaje. Para el tejido óseo, entre ellos encontramos cristales de hidroxiapatita, fosfato tricálcico y granulados óseos desvitalizados<sup>268 269</sup>.

Cuando se opta por la administración sistémica, el asegurar que las células pertinentes migren al tejido donde son necesarias resulta un paso imprescindible. La vía preferida para la administración sistémica de MSCs es la intravascular. Sin embargo, existe una ausencia de osteotropismo de las MSCs administradas por esta vía. Para paliar esto, se han desarrollado técnicas que tratan de favorecer la migración de las MSCs hacia el tejido diana. Las modificaciones de las proteínas de superficie CD44 han demostrado mejorar la capacidad de migración de las MSCs hacia el hueso en ratones NOD SCID<sup>270</sup>. Se ha descrito que la fucosilación ex vivo en posición  $\alpha$ 1,3 del antígeno CD44 mediante la enzima fucosiltransferasa VI (FTVI) produce una glicofoma de CD44 (HCELL) que es un potente ligando de E y L-selectina (expresadas de manera innata por las células

madre hematopoyéticas). Esta transformación incrementa la afinidad de las MSCs por la E selectina y por tanto su osteotropismo<sup>271</sup>.

Varios estudios preclínicos han explorado la administración tanto local como sistémica de MSCs autólogas o alogénicas en modelos animales.

La fuente más frecuentemente empleada para la obtención de las MSCs es la médula ósea. La inyección local en modelos murinos de osteoporosis de MSCs alogénicas obtenidas de roedores sanos demostró un aumento del hueso trabecular, una atenuación en la pérdida de la densidad mineral ósea y un aumento de la masa mineral ósea<sup>272 273</sup>. En un modelo de osteoporosis en conejos, la administración local de MSCs autólogas también produjo un aumento en el hueso trabecular<sup>274</sup>. En otros experimentos se ha llevado a cabo una administración sistémica de MSCs autólogas en modelos murinos de osteoporosis consiguiendo disminuir la reducción de masa ósea<sup>275</sup>  
<sup>276</sup>.

En otros estudios preclínicos la fuente de las MSCs fue el tejido adiposo. La administración local de MSCs obtenidas de grasa en modelos de ratones y de conejos de osteoporosis también demostró un aumento en el hueso trabecular, un aumento en la osteogénesis y una disminución en la adipogénesis<sup>277 278</sup>.

La administración de MSCs también se ha explorado en modelos de fractura. La administración local de MSCs autólogas (obtenidas de médula ósea) en ratones con fractura de tibia demostró una mayor capacidad de reparación de las fracturas y de mineralización ósea<sup>279</sup>. En humanos, la administración local de MSCs junto con matriz ósea desmineralizada se asoció con un menor tiempo de consolidación en pacientes intervenidos a causa de una fractura de tibia distal<sup>280</sup>.

A pesar de que los resultados del uso sistémico de MSCs para trastornos del esqueleto resultan prometedores, solo se han desarrollado de momento 2 ensayos clínicos para explorar su uso en humanos (NCT02566655 and NCT01532076). El primero fue finalizado debido a un reclutamiento lento, mientras que el segundo (infusión intravenosa de MSCs fucosiladas en pacientes con OP establecida) sigue pendiente de resultados.



# Objetivos



## **JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Justificación**

La OP es un trastorno cada vez más prevalente debido al progresivo envejecimiento de la población. Esta enfermedad acarrea una importante morbi-mortalidad, así como un gran impacto socioeconómico por lo que resulta una preocupación sanitaria importante.

Las MSCs son células adultas pluripotenciales con la capacidad para diferenciarse en osteoblastos, que son las células responsables de la formación ósea. Una adecuada formación de hueso por los osteoblastos es esencial para sustituir el hueso destruido por los osteoclastos y, en consecuencia, mantener el balance óseo. Una tasa de formación ósea insuficiente en comparación con la resorción conducirá irremisiblemente a la OP. Por otro lado, un proceso activo de formación ósea es clave durante el modelado del hueso que tiene lugar durante el periodo de crecimiento y durante los procesos de consolidación de las fracturas y otras lesiones localizadas del esqueleto.

En los últimos años, las MSCs se han postulado como una posible herramienta terapéutica en situaciones que requieren la regeneración del hueso o el cartílago.

El envejecimiento, y en concreto los procesos de senescencia, puede reducir el potencial proliferativo y reparador de algunos tipos celulares. Por otro lado, cabría plantear la posibilidad de que una insuficiente actividad de las MSCs esté implicada en la patogenia de la OP.

Sin embargo, los estudios in vitro que han valorado la capacidad de diferenciación osteogénica de las MSCs en pacientes con osteoporosis han ofrecido resultados contradictorios. En particular, estudios previos de nuestro grupo sugieren que las MSCs de los pacientes con fracturas osteoporóticas conservan una alta tasa de proliferación, pero una menor capacidad de diferenciación in vitro. De ahí que no esté claro si las MSCs de estos pacientes conservan o no su capacidad para la formación ósea in vivo. En cualquier caso, clarificar este punto es algo crucial de cara a plantear estas células como una posible terapia regenerativa en pacientes osteoporóticos.

## **Hipótesis**

Las MSCs de los individuos con OP conservan la capacidad para la formación ósea in vivo y, por tanto, podrían resultar útiles en el tratamiento de trastornos esqueléticos en estos pacientes.

## **Objetivos**

1. Comparar la capacidad de formación ósea in vivo de MSCs de pacientes con OP y controles con OA.
2. Explorar la utilidad de la administración sistémica de MSCs de pacientes con OP y controles con OA para favorecer la regeneración ósea en procesos de difícil tratamiento, en particular la ONM.
3. Elucidar si las MSCs de pacientes con OP presentan un fenotipo de senescencia en comparación con las MSCs de pacientes con OA.



# Material y Métodos



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Partes del estudio**

El estudio se dividió en tres partes:

- Comparación de la formación ósea in vivo de MSCs de pacientes con OP y de controles con OA.
- Estudio de la senescencia celular en MSCs de pacientes con OP y de controles con OA.
- Desarrollo de un modelo de ONM en ratones inmunodeprimidos. Una vez desarrollado el modelo, explorar la respuesta tras la administración sistémica de MSCs de pacientes con OP y de controles con OA.

### **Obtención y cultivo de MSCs**

Las MSCs se obtuvieron de la cabeza femoral y de la cresta iliaca de pacientes con OP y OA durante cirugías de recambio de cadera en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Aquellos casos de fractura en contexto de traumatismo de alto impacto, de OP secundaria o de OA secundaria fueron excluidos.

Mediante un trocar de 6 mm se obtuvieron muestras de hueso trabecular que fueron lavadas con 50mL de tampón fosfato salino (phosphate buffered saline, PBS) para eliminar la médula ósea roja.

Las células obtenidas se separaron mediante el gradiente de Ficoll (Lymphoprep™, Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Canada): una centrifugación utilizada para separar las células en función del gradiente de densidad. Este consiste en un método de purificar las células mononucleares de la sangre periférica aprovechando las diferencias de densidad encontradas entre las células mononucleares y otros elementos celulares que se encuentren en la muestra de sangre<sup>281</sup>. Se centrifugaba el lavado de los fragmentos a 1800 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células. Posteriormente, se eliminaba el sobrenadante y se golpeaba para romper el pellet y resuspenderlo en 5ml de PBS. Posteriormente, se añadían 5ml de Lymphoprep (STEMCELL Technologies Inc, Vancouver. Canada) en un f15. Lymphoprep es un medio

en gradiente de densidad que dividía en siguientes capas: PBS, capa leucocitaria, lymphoprep, eritrocitos y granulocitos. Se incorporaban los 5ml de suspensión de células y se centrifugaban durante 20 minutos (2000 rpm). Se recogía en un tubo f15 la capa de células blancas que se formaba entre el PBS y el Lymphoprep y se completaba hasta 15ml con PBS. Se realizaba una nueva centrifugación durante 5 minutos a 1800 rpm para sedimentar las células. Se resuspendían las células en 5ml de medio y se plaqueaba en un frasco de cultivo T25.

La interfaz resultante con células mononucleares se cultivó ( $2 \times 10^6$  per  $\text{cm}^2$ ) en un matraz de cultivo de poliestireno en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) junto con glucosa 4.5g/L, rojo de fenol y L-glutamina. Este medio fue suplementado con suero fetal bovino, 1% penicilina-estreptomicina, 1% anfotericina A (todos de Merck KGaA, Darmstad, Alemania. Se cultivaron las células en un incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y saturación de humedad. El primer cambio de medio se realizaba a los 3 días.

Se utilizaron células de los pases 2 para los experimentos. Muestras representativas fueron caracterizadas con tinción para antígenos de superficie en un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, Nueva Jersey, EEUU) con anticuerpos para CD45, CD34, CD90 y CD105.

Para comprobar la ausencia de contaminación por *Mycoplasma* sp utilizamos la siguiente técnica. Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo de cada "paciente", con un mínimo de 48 horas de contacto medio-cls, y se conservaron a -20°C hasta su análisis (si no lo hacíamos en el momento).

Las secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores fueron:

Mico A: 5'-GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3'

Mico B: 5'-CGGATAACGCTTGCGACCTATG-3'

Como control negativo de la amplificación se sustituyó el medio de cultivo por H<sub>2</sub>O libre de DNAsas y como control positivo se utilizó el sobrenadante de un cultivo celular contaminado, testado con anterioridad. La amplificación se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía por cada muestra:

- 5µl Buffer B (10X, with 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> at 1X, Roche Molecular Systems, California, EE.UU)
- 2,5µl de Mico A 10µM
- 2,5µl de Mico B 10µM
- 5µl de dNTPs 10 mM (Applied Biosystems, California, EE.UU).
- 2µl de sobrenadante
- 0,25 µl KAPA Taq DNA Polymerase (5 U/µL) (Roche Molecular Systems, California, EE.UU).
- 317,5 µl de H<sub>2</sub>O libre de DNAsas.

La amplificación se realizó en un termociclador (Applied Biosystem) con el siguiente programa de PCR:

94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C
5 min	1 min	1 min	1:30 min	5 min	∞
	30 ciclos				

Los productos de amplificación obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### **Formación ósea in vivo**

La capacidad de formación de hueso de las MSCs fue evaluada depositando implantes de MSCs en el tejido subcutáneo de los ratones inmunodeficientes, siguiendo protocolos previamente publicados<sup>282 283</sup>.

### **Preparación de los implantes**

Estos implantes estaban compuestos de una mezcla de MSCs con unas partículas que actuaban como andamiaje para las células. Utilizamos 4 tipos diferentes de partículas: fosfato tricálcico TCP, Sigma Aldrich, St Louis, USA), una mezcla de hidroxiapatita y fosfato tricálcico (CELLCERAM, Scaffdex CellCeram™, Tampere, Finlandia) y dos preparaciones de granulado óseo desvitalizado (demineralized bone matrix, DBM) (DBM1, BIO-OSS, Geistlich Bio-Oss Spongiosa, New Jersey, USA; DBM2, NUOSS, Ace surgical, USA). (granulado óseo desvitalizado) y NUOSS (granulado óseo desvitalizado).

Para la preparación de los implantes, empleábamos jeringas de 1ml a las que les recortábamos el extremo donde normalmente queda encajada la aguja. Con cuidado, añadíamos 40 mg de partículas en cada jeringa y la cerrábamos con un hisopo. Los implantes se preparaban el día antes de colocarlos en los ratones y estaban un mínimo de 24 horas en el incubador previo a colocarlos. Al añadir las células sobre las partículas, las movíamos bien con la pipeta, pero sin agitar. Después se dejaban sin mover en el incubador.

Previamente a su uso, las partículas se esterilizaban por autoclave. El proceso de esterilización se realizaba por si e hubiesen contaminado durante la manipulación ya que todas venían esterilizadas de fábrica.

Las jeringas con las partículas quedaban identificadas de manera individual y se guardaban en bolsas tras haber sido autoclavadas en el incubador hasta su uso. Todos los procedimientos se realizaban siempre en campana de cultivos celulares. Una vez se iban a realizar los implantes, se abrían los paquetes con las jeringas con las partículas dentro de la campana, y se añadía 100 µl de medio (DMEM +P/S +FUNGI +10% FCS) a cada jeringa para humedecer las partículas y evitar la electricidad estática. Se movía con la punta de la pipeta y con el émbolo para asegurar que todas quedaban en contacto con el medio. Entonces, se procedía a despegar las células, recoger, centrifugar y contarlas. Se añadía  $1,5-2 \times 10^6$  MSCs a cada jeringa con partículas en un volumen de 200 µl. Se movía con la punta de la pipeta y el émbolo al añadir sobre las partículas para asegurar la mezcla de las células. Posteriormente se cerraba con un hisopo o un tubo boca abajo. Se mantenía la preparación en el incubador hasta que se fueran a realizar los implantes y, entonces, se metían transportaban en dobles bolsas estériles hasta el estabulario.

#### Introducción de los implantes en el modelo animal

Empleamos ratones inmunodeficientes NOD.CB17-Prkdcscid/J mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) que son preferibles a otros ratones inmunodeprimidos a la hora de injertarles células humanas primarias<sup>284</sup>. Los ratones permanecieron en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal de la Universidad de Cantabria bajo condiciones de asepsia y vigilancia veterinaria. Utilizábamos ratones de entre 8 y 10

semanas de edad. Para la anestesia se les administró una mezcla de medetomidina, ketamina y buprenorfina (100  $\mu$ l de medetomidina, 80  $\mu$ l de ketamina, 30  $\mu$ l de buprenorfina y 290  $\mu$ l de suero) (dosis 500  $\mu$ l/100 gramos de ratón) por vía intraperitoneal. Tras retirar el pelo del lomo se les realizaron 3 incisiones superficiales de en torno a 1 cm de largo. Con la ayuda de una jeringa se separaba la piel del tejido subcutáneo formando una especie de bolsillo donde poder depositar la mezcla con las células. Tras eliminar el exceso de medio, la mezcla era colocada a nivel subcutáneo en el dorso del ratón. Una vez depositado el implante se realizaba una sutura para cerrar el bolsillo creado. En cada ratón se realizaron 3 implantes subcutáneos para facilitar las comparaciones de la actividad osteogénica entre diferentes grupos de MSCs y los controles (figura). Una vez finalizado el procedimiento se les administraba de antídoto Antisedan (20  $\mu$ l de antipamezol y 80  $\mu$ l de suero) (100  $\mu$ l por ratón). Durante la intervención los ratones eran colocados sobre una manta eléctrica para reducir la posibilidad de desarrollo de hipotermia. Tras 12 semanas, los ratones fueron sacrificados y se les retiraron los implantes.

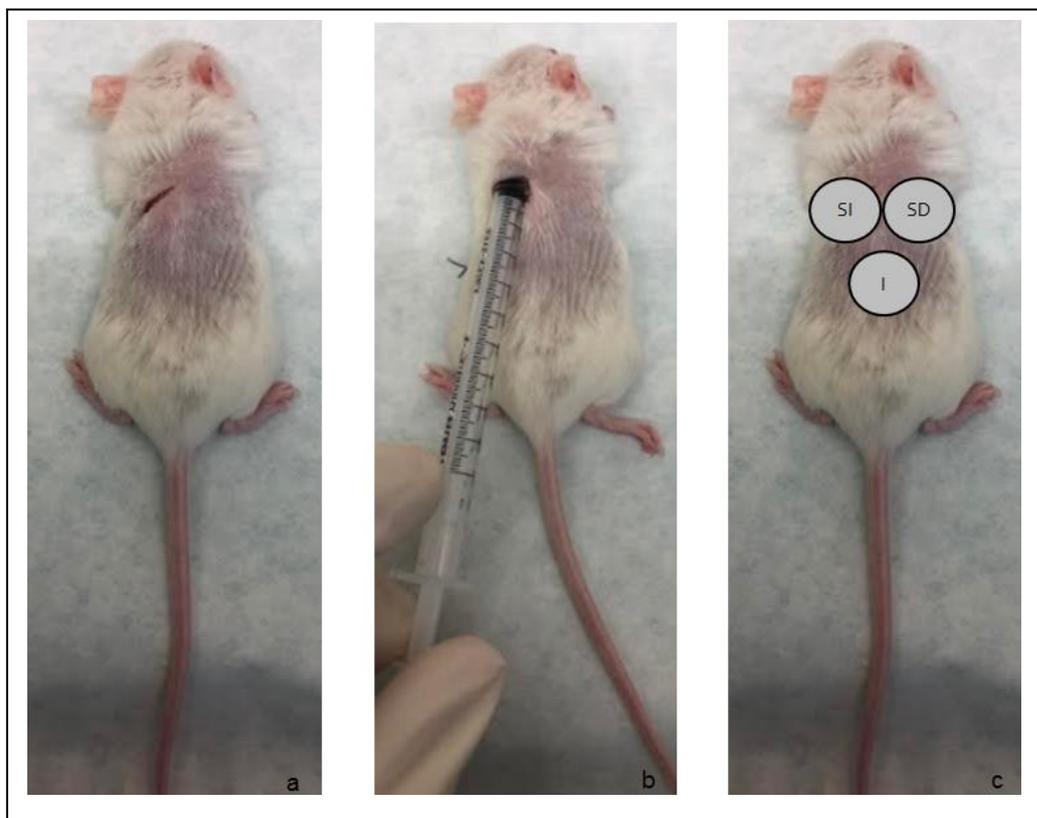


Figura 10. a) Muestra de incisión superficial. b) Muestra el depósito en tejido subcutáneo de las MSCs. c) Localizaciones de depósito subcutáneo.

### Procesamiento y estudio de los implantes

Una vez retirados los implantes, algunos se fijaron en formol 10% (10% NEUTRAL BUFFERED FORMALIN (CellPath, UK) durante 36-48 horas y se pasaron a 20% EDTA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO EE. UU) en PBS pH 7,4, temperatura ambiente para ser descalcificados. Se cambiaba el EDTA 2 veces por semana y se comprobaba el estado de decalcificación a tacto (apretando un poco con los dedos). Estaban en decalcificante una media de 6-8 semanas.

### Inclusión, corte y tinción de los implantes

El siguiente paso era la inclusión en parafina. Para ello, se sacaban los implantes del EDTA, se colocaban en un cassette de histología y se depositaban en un frasco con formol. El frasco era enviado al laboratorio de Anatomía Patológica para el procesamiento de tejidos en robot (inclusión automatizada).

Al terminar el procesado en el robot, se montaban los bloques de parafina para realizar los cortes. Primer se vertía una capa fina de parafina en el fondo de unos cassettes metálicos de tamaño adecuado a las piezas. Posteriormente se orientaba el tejido en el cassette metálico y se cubría el resto del espacio con más parafina. Tras esto se colocaba el cassette de plástico con orificios a modo de tapa y se dejaba enfriar. El corte se realizaba con un micrótomo de rotación.

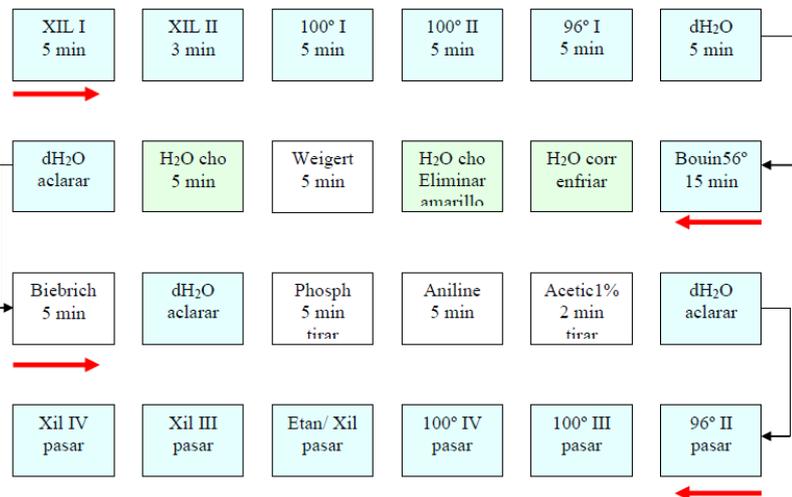
Utilizamos 2 tinciones diferentes: hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. La técnica de tinción es diferente para cada colorante, los pasos en común son los correspondientes a la desparafinación e hidratación de los cortes previo a teñir.

En los esquemas siguientes se resumen los pasos de ambas tinciones.

## H&E REGRESSIVE STAIN SETUP



La técnica del tricrómico de Masson era la siguiente:



Utilizamos 2 kits comerciales:

- Trichrome Stain (Masson) Kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO EE. UU).
- Accustain Weigert's iron hematoxylin set (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO EE. UU).

El montaje de los cortes ya teñidos se realizaron con Eukitt quick-hardening mounting media (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO EE. UU).

Algunos implantes no fueron utilizados para análisis histológico, sino que se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C previo a la realización de un estudio de expresión de genes humanos a través de RT-qPCR mediante métodos estándar<sup>285</sup> y ensayos Taqman específicos. Se estudiaron los genes COL1A1 (que codifica

la cadena alfa del colágeno tipo 1); ALPL (fosfatasa alcalina); BGLAP (osteocalcina) e IBSP (sialoproteína).

- Aislamiento de RNA Homogenización: Se colocaba una mitad de la placa Petri estéril sobre el hielo seco, ligeramente inclinada y con la base en contacto con el hielo. Se añadía 1 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) y rápidamente se depositaba el implante encima. Tras dejarlo congelar unos segundos, se retiraba el hielo seco y, con la parte posterior del émbolo, se machaba el implante hasta deshacerlo obteniéndose un trizol un poco viscoso y restos de partículas en forma de polvo-grano fino. Se recogía todo el contenido con la punta de pipeta recortada y se dejaba atemperar hasta que alcanzara temperatura ambiente.
- Separación: Posteriormente, se añadían 200 µl de cloroformo y se agitaba el tubo manualmente durante 15 segundos. Se dejaba reposar 2-3 minutos y se centrifugaba a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- Precipitación de ARN: Se recuperaba la fase acuosa superior (sin llevarnos la interfase) y se transfería a un tubo donde se añadía el mismo volumen recuperado de isopropanol (unos 600 µl). Tras esto se procedía a mezclar e incubar a -80°C durante 30 min. Centrifugar 13000 rpm—10 min—4°C. El precipitado de RNA, a veces visible tras esta centrifugación, formaba un pellet en el fondo del tubo.
- Lavado del ARN: Se decantaba el sobrenadante y se lavaba el pellet con 1 ml de etanol 80%. Se centrifugaba a 8000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- Resuspensión del ARN: Posteriormente se decantaba el sobrenadante y se dejaba secar el pellet que luego se resuspendía en 20 µl de agua RNase-free. Se dejaba en hielo durante 30 minutos para asegurar que se resuspendiera.

#### Retrotranscripción (síntesis de ADNc)

Se preparó una mezcla con: RT primers (x5) 2 µl, PrimeScript RT Enzyme Mix 0,5 µl, oligo dT Primer 0,5 µl y Random hexamers 0,5 µl. A cada tubo de PCR se le añadía entonces la cantidad correspondiente de RNA (250ng) y el volumen de agua libre de RNasa necesario hasta completar hasta 10 µl. Se introducía la mezcla en el termociclador con el siguiente programa: a 37°C durante 15 minutos, a 85°C durante 5 segundos y se mantuvo finalmente a 4°C. Se diluía entonces 1/4 con agua libre de RNasa.

## PCR cuantitativa

Utilizábamos placas de 96 pocillos adecuadas para nuestro equipo Abi 7300. En cada pocillo se realizó una mezcla con 5 µl de Taqman Universal Master Mix, 3,5 µl de agua libre de RNAsa 0,5 µl de Taqman microRNA mix. En cada pocillo se añadía además 1 µl de la RT (ya diluida). Se sellaba la placa, se centrifugaba y se llevaba al equipo de cuantitativa en modo 7300 emulation, con un ciclo a 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

## Análisis de los resultados

El estudio histológico se llevó a cabo por parte de 3 observadores ciegos usando una escala semicuantitativa (tabla). Se examinaron al menos 4 secciones de cada implante. En caso de discrepancia en cuanto a la valoración de los distintos observadores, se revisaban las muestras y se alcanzaba un consenso. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante análisis con Chi<sup>2</sup> o test exacto de Fisher.

<b>Valoración histológica</b>	<b>Significado</b>
0	Ausencia de formación ósea.
1	1 trabécula ósea.
2	2 trabéculas óseas.
3	Más de 2 trabéculas, pero < del 50% de la superficie disponible con evidencia de formación ósea.
4	> 50% de la superficie disponible con evidencia de formación ósea.

Tabla 4. Significado de cada valoración histológica.

El estudio de expresión génica se realizó mediante PCR a tiempo real. El ciclo umbral (threshold cycle, Ct) fue estimado para cada muestra. Un Ct <35 se consideró como una expresión génica positiva. La expresión de los genes relacionados con la osteogénesis fue comparada con el gen control (“housekeeping”) GAPDH y su expresión relativa se estimó como  $2^{\Delta Ct}$  siendo  $\Delta Ct$  la diferencia entre el Ct del gen control y el Ct del gen a estudio. Las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando la U de Mann-Whitney.

## **Senescencia celular**

### **Estudio de expresión de genes asociados a fenotipo secretor de senescencia (SASP)**

Estudiamos la expresión de genes asociados a la senescencia en cultivos de MSCs de pacientes con OP (n=10) y OA (n=9). Se extrajo RNA de las MSCs empleando Trizol® (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Tras el control de calidad con un análisis Agilent RNA Screen Tape, se prepararon las muestras usando el protocolo NEBNext Ultra Directional RNA Library Protocol (Illumina, San Diego, California, USA). Las bibliotecas resultantes fueron secuenciadas en un secuenciador Illumina Hi-Seq 2000 (NTX-Dx, Gent, Belgium) como se ha descrito en protocolos previos<sup>286</sup>. Se realizó el análisis de expresión con cufflinks v2.1.1. Se calcularon valores FPKM para cada gen y transcrito anotados. Se realizó un análisis RNAseq con el paquete Bioconductor EdgeR<sup>287</sup>. Basándonos en estudios previos<sup>288 289 290</sup> incluimos como genes marcadores de senescencia citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas y otros factores de crecimiento (IL1B, IL1R, IL6, IL6R, IL8, IL10, CXCL1, CXCL2, CCL7, CXCL4, CXCL5, CXCL12, CXCL6, CCL8, CCL13, CCL2, CCL16, CCL26, CCL20, CCL3, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, CSF2, TNF, IFN and PGE2 ), proteasas extracelulares (MMP3, MMP10, MMP1) y factores del ciclo celular (TP53, TP53BP2, ATM, MDM2, CDC25, CDKN2A, RB1, CDKN1A).

### **Estudio de expresión de p16 y p21**

Adicionalmente, la expresión de los efectores de senescencia p16 y 21 fue medida mediante RT-qPCR. ADN complementario (cDNA) fue sintetizado con el kit TaKaRa PrimeScript RT (TaKaRa, Shiga, Japan), usando 1 µg de ARN. La abundancia de transcritos de los genes “housekeepin”g (GAPDH y RPL13A) fue evaluada mediante RT-qPCR utilizando ensayos Taqman (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las reacciones de amplificación se realizaron en duplicado en placas de 96 pocillos en Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System. La reacción con los primers p16 y 021 contenía Sybrgreen master mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Los primers empleados se muestra en la tabla 5.

Nombre	Secuencia (5' a 3')
p16-fwd	CTTCCTGGACACGCTGGTG
p16-rev	ATGGTACTGCCTCTGGTGC
p21-fwd	GCGACTGTGATGCGCTAATG
p21-rev	GAAGGTAGAGCTTGGGCAG G
GAPDH	Taqman Hs99999905_m1
RPL13A	Taqman Hs04194366_g1

Tabla 5. Nombre y secuencia de los primers empleados.

### Estudio de expresión de la actividad de beta-galactosidasa

Estudiamos también la expresión de la actividad de la beta-galactosidasa como marcador alternativo de senescencia. Realizamos el estudio utilizando el Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands). Para ello,  $10^5$  MSCs subconfluentes fueron cultivadas en 12 pocillos y las células senescentes fueron contadas en tres momentos (en los días 1, 3 y 7). La línea celular osteoblástica inmortalizada HOS fue empleada como control negativo. Las células teñidas de azul fueron consideradas como células senescentes y contadas mediante microscopio.

### Desarrollo de modelo de ONM en ratones inmunodeprimidos

#### Extracción dental y administración de tratamientos

Siguiendo los protocolos publicados con ratones inmunocompetentes<sup>291</sup>, se realizó la extracción del 1<sup>er</sup> molar izquierdo tras anestesiarse ratones NOD/SCID de 8 semanas de edad. Se les administraron distintas pautas de ácido zoledrónico (cada dosis, de 540  $\mu$ g/kg) cuya primera administración se realizó en todos los casos una semana antes de la extracción. Algunos ratones recibieron el bisfosfonato por vía intraperitoneal mientras que a otros se les administró por vía intravenosa.

#### Inyección intraperitoneal

Empleamos jeringas de 0,5ml y agujas habitualmente utilizadas para inyecciones subcutáneas. Durante la administración intraperitoneal de fármacos no era necesario anestesiarse a los ratones. Se realizaba la inyección con el bisel de la aguja orientado hacia

arriba y con un ángulo de 30 grados respecto al abdomen del animal. El lugar de la inyección era el cuadrante inferior derecho del abdomen para evitar dañar estructuras intraabdominales. Antes de la inyección se realizaba una aspiración para comprobar que no se había puncionado ni un vaso ni un órgano.

#### Inyección intravenosa<sup>292</sup>

Empleamos jeringas de 0,5ml y agujas subcutáneas. Posicionábamos la aguja en el espacio retrobulbar (región situada detrás del globo ocular) por lo que el ratón debía estar anestesiado para asegurar que permaneciera quieto durante el procedimiento. Al tratarse de un operador diestro, resultaba más fácil la administración de la inyección en el seno retroorbitario derecho del ratón. Tras aplicar una presión suave en la piel dorsal y ventral del ojo se conseguía que el globo ocular sobresaliese parcialmente facilitando así la introducción de la aguja en el canto medial del ojo con una inclinación de 30 grados. Una vez introducida la aguja se inyectaba el contenido sin realizar una aspiración previa. Tras la inyección se realizaba una retirada lenta y cuidadosa de la aguja.

#### Extracción dental

Una semana tras la primera inyección de zoledrónico, se realizaba la extracción dental. Tras haber anestesiado a los ratones, se extirpaba el primer molar utilizando un fórceps quirúrgico. Una vez realizada la extracción se procedía a la administración de analgesia y de antídoto para revertir los efectos de la anestesia.

De los que recibieron el zoledrónico por vía intraperitoneal, unos recibieron 5 dosis del tratamiento (una semanal) y fueron sacrificados a las 5 semanas de la extracción, mientras que otros recibieron únicamente 3 dosis y fueron sacrificados a las 3 semanas de la extracción. Los que recibieron zoledrónico por vía intravenosa recibieron únicamente 2 dosis del bisfosfonato y fueron sacrificados a las 2 semanas de la extracción. En ambos grupos además se administró en algunos casos dexametasona subcutánea en formulación retardada.

### Estudio radiológico

Los maxilares de los ratones sacrificados se fijaron en formaldehído y se conservaron en etanol para estudio mediante microtomografía computarizada (microTC) (Bruker).

### Análisis histológico

Tras la realización del microTC, los maxilares fueron fijados en formalina durante 48 horas. Posteriormente fueron decalcificados con un decalcificador rápido con corrector salino (Descalcificador Rápido Casa Álvarez (Ref: 10-6551)) durante 6-8 horas. Tras este proceso fueron aclarados con agua durante 1 hora o 3 cambios de PBS pH 7,4 de 20 minutos cada uno. Tras el aclarado con agua o PBS, se recortaba la zona de interés desechando gran parte del cráneo y de la mandíbula. Se pasaba el fragmento a un cassette, se sumergía en formol y se procesaba siguiendo el mismo protocolo que el realizado en las muestras de los implantes subcutáneos. Se realizaron los cortes con un microtomo de rotación. Se realizaba un ajuste del grosor de los cortes para conseguir secciones completas sin ningún tipo de artefacto llegando en algunos casos a las 7 micras. fueron teñidos con Hematoxilina-eosina para su valoración mediante microscopía óptica. La existencia de ONM se definió por la presencia de áreas con al menos 5 lagunas osteocíticas vacías y ausencia de cicatrización de la mucosa<sup>291</sup>.

### Aspectos éticos

Se obtuvo un consentimiento informado de los pacientes que donaron las MSCs, siguiendo las normas del Comité de ética en investigación clínica de Cantabria y tras aprobación pro dicho Comité.

En cuanto a los experimentos con animales, se obtuvo una aprobación de protocolos por parte del Comité de ética de La Universidad de Cantabria y de la Consejería de Sanidad de Cantabria según la legislación vigente.



# Resultados



## RESULTADOS

### 1. Estudio de la formación de hueso in vivo.

#### Histología

Se realizó un estudio histológico de los implantes por parte de 3 observadores independientes, no conocedores del grupo al que pertenecía la muestra ni de las valoraciones de los otros dos observadores. De cada implante se valoraron al menos 4 secciones, teñidas con Hematoxilina-eosina y Tricrómico de Masson.

Se valoró el desarrollo de formación ósea por la presencia de trabéculas óseas en las superficies de las partículas (“scaffolds”). Esas trabéculas presentaban con frecuencia una estructura laminar y lagunas osteocíticas. Según el grado de formación ósea se realizó un análisis semicuantitativo asignándole a cada implante un valor de 0 a 4.

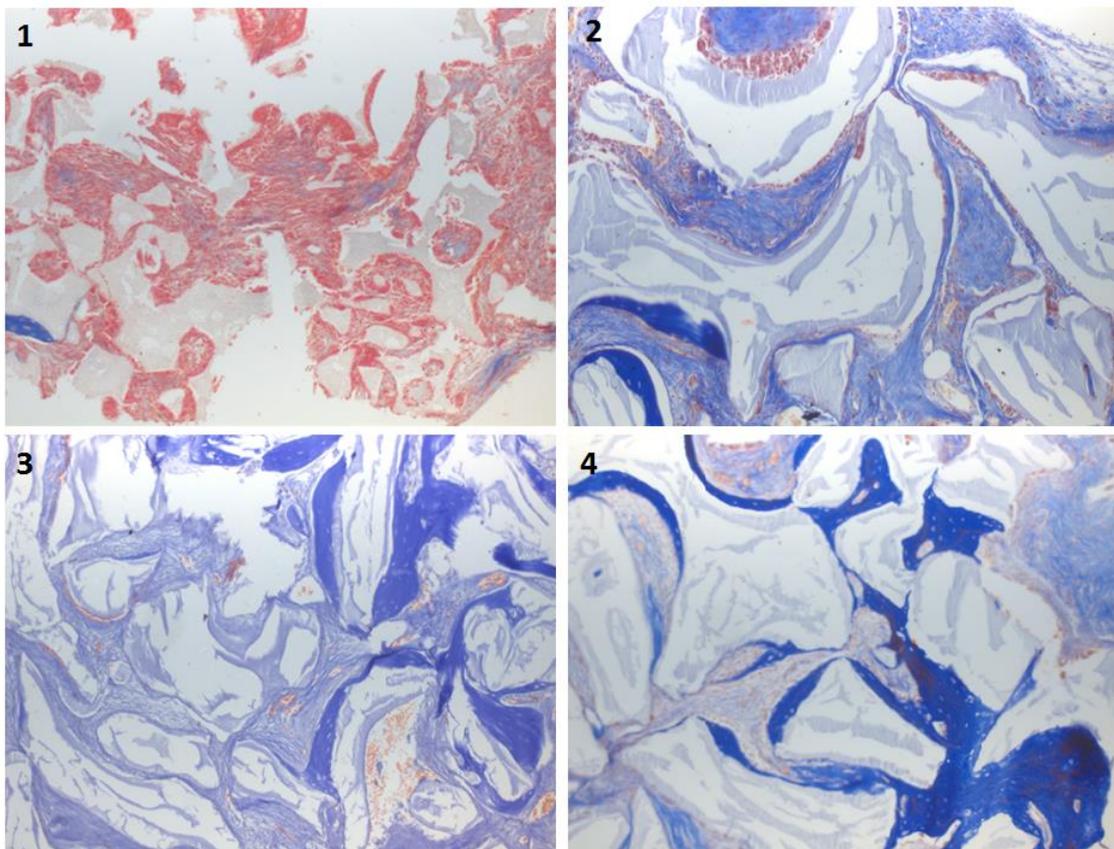


Figura 11. Imágenes representativas de los diferentes grados de formación ósea en los implantes subcutáneos utilizando la tinción del Tricrómico de Masson. El nuevo hueso se ve teñido en azul oscuro. Los paneles 1-4 son representativos de los grados de formación ósea 1-4 respectivamente (indicados en Material y Métodos).

### **Análisis en función de la existencia o no de MSCs en los implantes**

Se analizaron un total de 136 implantes obtenidos de 67 ratones diferentes. De estos implantes, 103 contenían MSCs; 47 de ellos correspondían a pacientes con OP y 56 a pacientes con OA.

Globalmente, entre los implantes con MSCs, 47 (44,8%) presentaban algún grado de formación ósea, frente a solo 6 (18.1%) de los implantes sin MSCs ( $p=0,005$ ) (Figura 12).

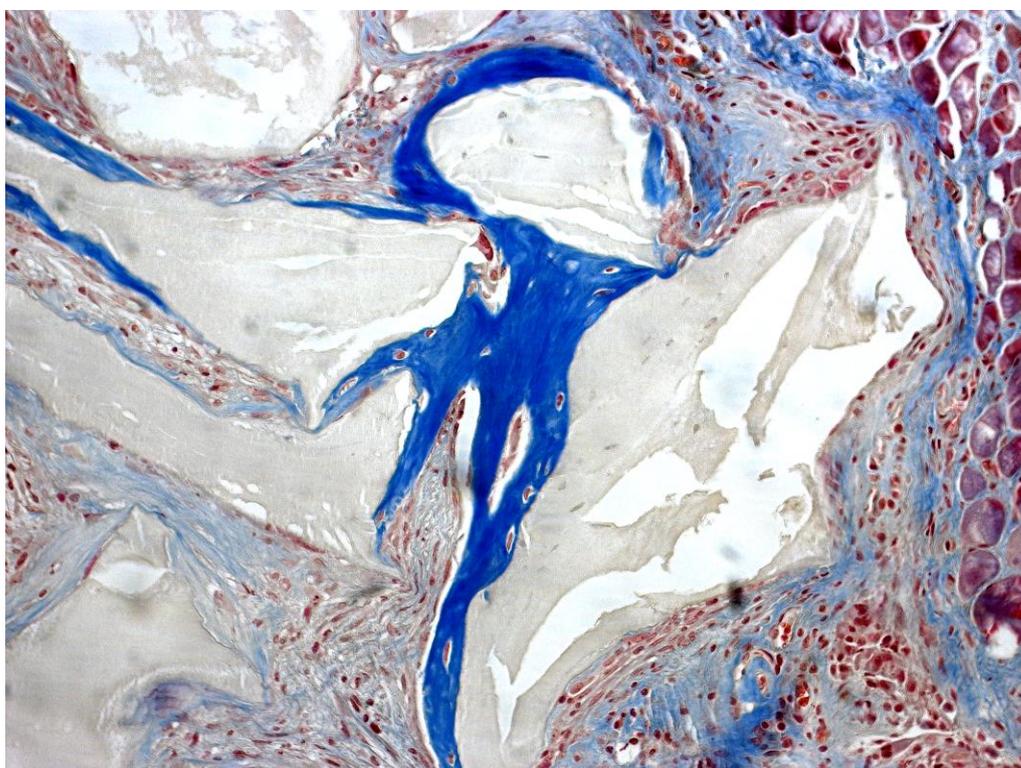


Figura 12. Tinción con Tricrómico de Masson x20. Formación de nuevo hueso (en azul oscuro) en la superficie de las partículas (en gris).

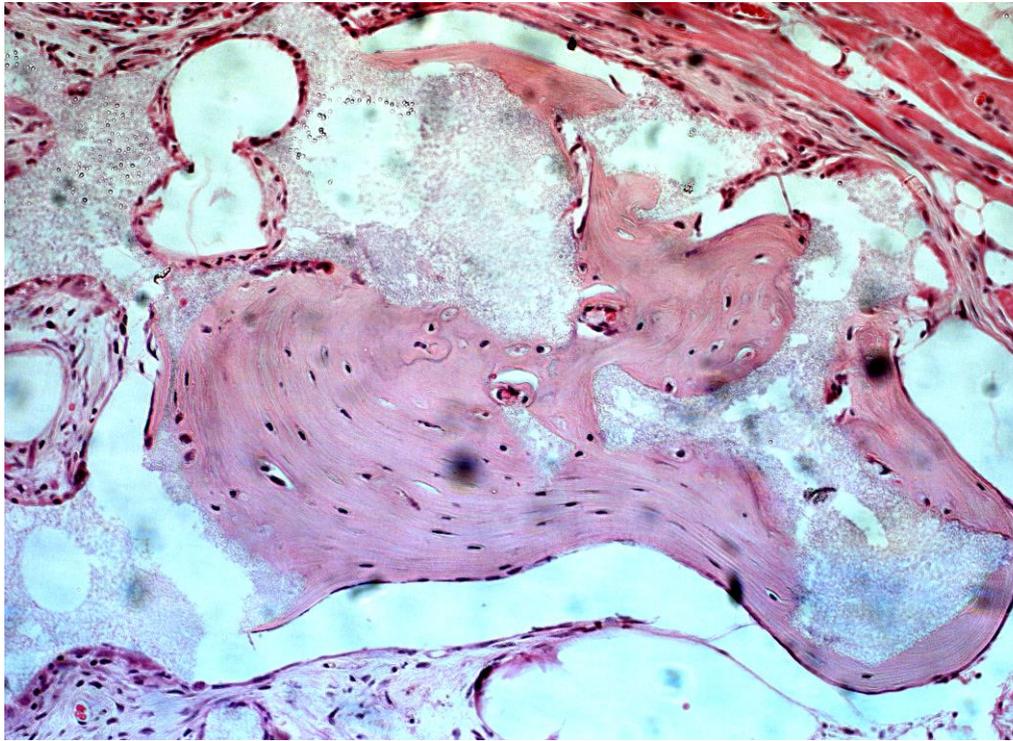


Figura 13. Tinción con hematoxilina-eosina x20. Se puede observar el nuevo hueso con una estructura de láminas concéntricas de la matriz ósea (teñida en rosa) con lagunas de osteocitos en su interior.

En la mayoría de los implantes sin células en los que hubo alguna formación de hueso, ésta era muy escasa. De hecho, de los 6 implantes realizados sin células en los que se objetivó formación ósea, 4 (12,1% del total de implantes sin células) recibieron un valor en la escala semicuantitativa de 1, 1 (3%) recibió un valor de 2 y 1 (3%) de 4.

De los 47 implantes realizados con células en los que se objetivó formación ósea, 23 (22,3% del total de implantes con MSCs) recibieron un valor de 1 en la escala semicuantitativa, 13 (12,6%) de 2, 7 (6,8%) de 3 y 4 (3,9%) de 4. (Tabla 6)

	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Sin MSCs (n=33)</b>	27 (81,8%)	4 (12,1%)	1 (3,0%)	0 (0%)	1 (3,0%)
<b>Con MSCs (n=103)</b>	56 (54,4%)	23 (22,3%)	13 (12,6%)	7 (6,8%)	4 (3,9%)

Tabla 6. Grados de formación ósea de los implantes con y sin MSCs expresados de manera semicuantitativa.

### **Análisis en función del origen de las MSCs**

La evaluación de la formación ósea in vivo se realizó utilizando MSCs de 53 pacientes (29 OP, 20 mujeres, 9 hombres, edad media  $84 \pm 9$ ; 24 OA, 11 mujeres, 13 hombres, edad media  $72 \pm 9$ ). Las características de los pacientes se encuentran resumidas en la Tabla 7. Por lo general, las células obtenidas de cada individuo fueron utilizadas en 2 implantes (entre 1 y 3 en función de la disponibilidad).

	OP	OA
Edad, media $\pm$ DE	$84 \pm 9$	$72 \pm 9$
Mujeres, %	69	46
Índice de masa corporal, $\text{kg}/\text{m}^2$	-	$27,2 \pm 4,4$
Diabetes tipo 2, %	43	10
Hipertensión arterial, %	74	45
Tratamientos		
- Inhibidores de la bomba de protones, %	35	40
- Antidepresivos, %	17	10
- Anticoagulantes, %	13	10
- Antiplaquetarios, %	26	10
- IECAs o ARAII, %	39	25
- Bifosfonatos, %	4	0

Tabla 7. Características de los pacientes de los que se obtuvieron células para el análisis histológico de los implantes.

Se evaluaron un total de 103 implantes; 47 de ellos contenían MSCs obtenidas de pacientes con OP (16 con células obtenidas de hombres, 31 de mujeres) y 56 con MSCs de pacientes con OA (32 hombres, 24 mujeres).

La concordancia inter-observador varió entre un 76-82% (todas las  $p < 1,4 \times 10^{-9}$ ) con valores kappa entre 0,53 y 0,59 (todas las  $p < 1,3 \times 10^{-8}$ ) para la presencia de formación ósea. En el análisis semicuantitativo, la “pairwise correlation coefficient” varió entre un 0,66 y 0,7 (todas las  $p < 1,1 \times 10^{-15}$ ) con valores kappa entre 0,43 y 0,45 ((todas las  $p < 1,3 \times 10^{-15}$ ).

No todos los implantes con MSCs mostraron formación ósea en el análisis histológico, pero la frecuencia de hueso ectópico fue similar en ambos grupos de estudio. De los 47 implantes con MSCs de pacientes OP, 21 (44,7%) presentaban formación de hueso en el estudio histológico comparado con 26 (46,4%) de los 56 implantes con células de OA ( $p=0,859$ ).

De manera similar, el análisis semicuantitativo mostró grados similares de formación ósea en ambos grupos. Los 47 implantes con MSCs de pacientes OP fueron clasificados de la siguiente manera en la escala semicuantitativa: 26 (45,3%) con un 0, 12 (21,4%) con un 1, 9 (16,1%) con un 2, 3 (5,4%) con un 3 y 2 (3,6%) con un 4.

De los 56 implantes con MSCs de pacientes OA: 30 (43,6%) fueron clasificados como 0, 11 (23,4%) como un 1, 4 (8,5%) como un 2, 4 (8,5%) como un 3 y 2 (4,7%) como un 4 ( $p=0,861$ ) (Figura 13).

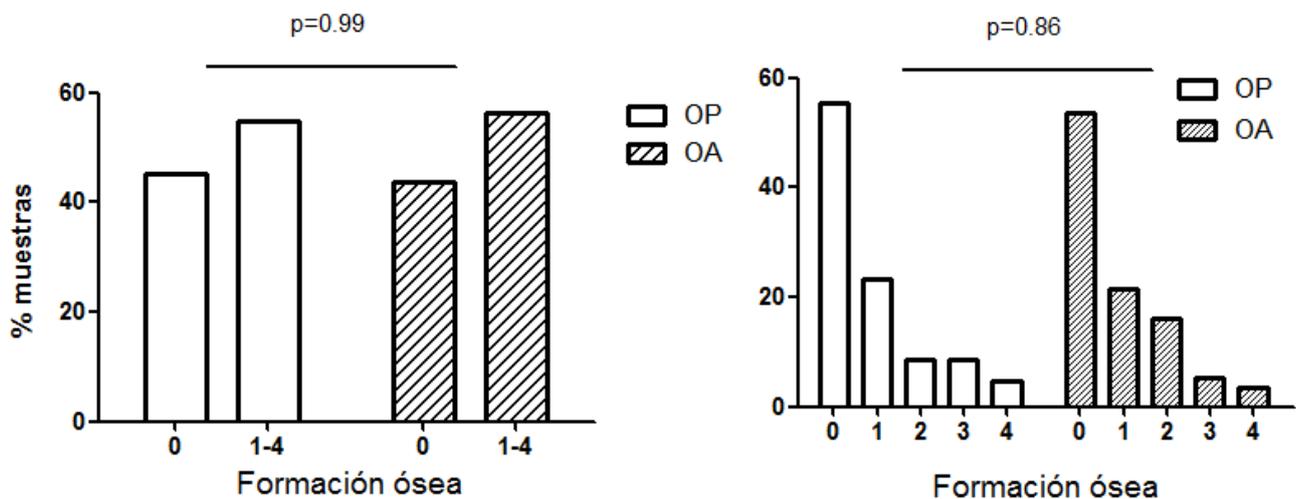


Figura 13. Formación ósea in vivo a partir de MSCs de pacientes con OP y con OA, expresados de manera dicotómica (izquierda) y semicuantitativa (derecha).

### Análisis en función del sexo

No existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar la formación ósea entre sexos y tampoco al estratificarlos según el tipo de paciente.

55 implantes contenían células obtenidas de mujeres (31 OP, 24 OA) y 48 implantes contenían MSCs obtenidas de hombres (16 OP, 32 OA).

De los 31 implantes con MSCs de mujeres con OP, se evidenció formación ósea en 12 (38,7%) frente a 9 de 24 (37,5%) de las obtenidas de mujeres con OA.

En el caso de los hombres, 9 de los 16 implantes (56,3%) con OP presentaron formación ósea, proporción similar a la observada en el otro grupo, pues se observó formación de hueso nuevo en 17 de los 32 implantes (53,1%) con MSCs de OA.

	Formación de hueso				
	0 (n, %)	1 (n, %)	2 (n, %)	3 (n, %)	4 (n, %)
<b>Mujeres (n =55)</b>	34 (61,8%)	12 (21,8%)	6 (10,9%)	2 (3,6%)	1 (1,8%)
- OA (24)	15 (62,5%)	4 (15,4%)	4 (15,4%)	1 (4,2%)	0 (0%)
- OP (31)	19 (61,3%)	8 (25,8%)	2 (6,5%)	1 (3,2%)	1 (3,2%)
<b>Hombres (n= 48)</b>	25 (52,1%)	11 (22,9%)	7 (14,6%)	6 (12,5%)	3 (6,25%)
- OA (32)	15 (46,9%)	8 (25%)	5 (15,6%)	2 (6,25%)	2 (6,25%)
- OP (16)	7 (43,8%)	3 (18,8%)	2 (12,5%)	3 (18,8%)	1 (6,25%)

Tabla 8. Valoración en escala semicuantitativa de los implantes según el sexo y el tipo de paciente del que se obtuvieron las MSCs.

### Análisis en función de la edad

La edad media del grupo de OA fue de  $71,5 \pm 8,6$  años y de  $83,7 \pm 8,8$  años en el grupo de OP.

Entre los pacientes con OA, 45 (80,4%) eran menores de 80 años, frente a tan solo 12 (21,4%) de los pacientes con OP ( $p < 0,001$ ).

Se evidenció formación ósea en el 45,6% de los implantes realizados con células de pacientes menores de 80 años. De manera similar, se objetivó formación de nuevo

hueso en el 45,7% de los implantes realizados con MSCs de pacientes con edades por encima de los 80 años ( $p$  (Chi2) = 0,845).

Realizamos también un análisis según la edad separando los implantes dependiendo de si las células habían sido obtenidas de pacientes OP o con OA.

En los implantes con MSCs obtenidas de pacientes con OA, se evidenció formación ósea en el 42,2% de los realizados con células de menores de 80 años frente al 63,6% de los que contenían células de pacientes mayores de 80 años ( $p=0,313$ ).

En el caso de los implantes con MSCs de pacientes OP, se objetivó formación ósea en el 58.3% de los casos en los que se emplearon células de menores de 80 años. En implantes con células obtenidas de pacientes OP con edades por encima de los 80 años se describió formación ósea en un 40% de los casos ( $p=0,326$ ).

Por tanto, a pesar de que existían diferencias en cuanto a la edad entre ambos grupos de pacientes, no hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar la formación ósea entre ambos.

	Formación de hueso	
	0 (n, %)	1-4 (n, %)
<b>Total (103)</b>		
- <80 (57)	31 (54,4%)	26 (45,6%)
- >80 (46)	25 (54,3%)	21 (45,7%)
<b>OA (56)</b>		
- <80 (45)	26 (57,8%)	19 (42,2%)
- >80 (11)	4 (36,3%)	7 (63,6%)
<b>OP (47)</b>		
- <80 (12)	5 (41,7%)	7 (58,3%)
- >80 (35)	21 (60%)	14 (40%)

Tabla 9. Porcentaje de implantes con formación ósea según la patología y la edad del paciente del que se obtuvieron las MSCs.

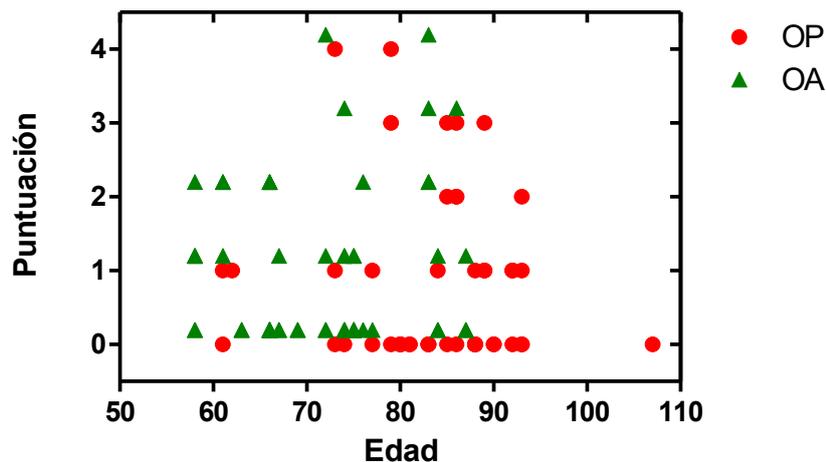


Figura 14. Grados de formación ósea en función de la edad del grupo del que se obtuvieron las MSCs (OP u OA).

### Análisis en función del tipo de partícula

Realizamos un análisis en función del tipo de partícula/scaffold empleado en cada uno de los 136 implantes.

- 25 implantes fueron realizados con TCP. 17 de ellos contenían MSCs (11 OP, 6 OA). Se evidenció formación ósea en 1 (12,5%) de los implantes sin células, 2 (33,3%) de los implantes con células OA y 4 (36,4%) de los implantes con células OP.
- 25 implantes fueron realizados con TCP/HAP (CELLCERAM); 20 de los mismos contenían MSCs (8 OP, 12 OA). No se evidenció formación ósea en ninguno de los implantes sin MSCs. Sí que se objetivó formación de hueso en 4 (50%) de los implantes con células OP y en 7 (58,3%) de los implantes con células OA.
- 70 implantes fueron realizados con Bio-Oss (DMB1). De estos, 54 tenían MSCs (25 OP, 29 OA). Se evidenció formación ósea en 4 (25%) de los implantes sin células, 12 (41,4%) de los implantes con células OA y 10 (40%) de los implantes con células OP.
- 16 implantes fueron realizados con NUOSS (DMB2). 12 contenían células (3 OP, 9 OA). Se objetivó formación de hueso en 1 (25%) de los implantes sin MSCs, en 2 (66,7%) de los implantes OP y en 5 (55,6%) de los implantes OA.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la formación de hueso según los distintos tipos de partículas.

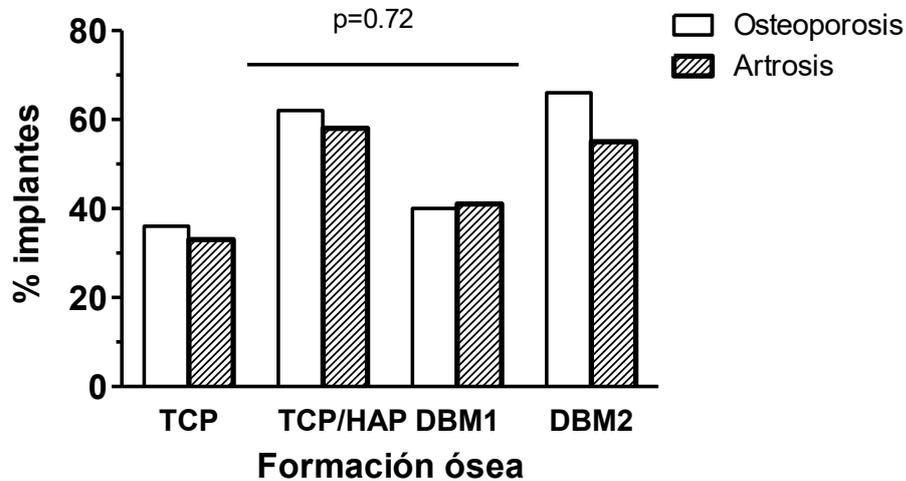


Figura 15. Formación ósea a partir de MSCs obtenidas de pacientes con OP y OA con diferentes tipos de partículas.

### Análisis según la localización del implante

Como ya hemos descrito, los implantes se depositaron en 3 posiciones en el lomo de los ratones: a nivel superior derecho, superior izquierdo e inferior. A efectos de descartar un efecto de la posición del implante sobre la capacidad osteogénica, se hizo un análisis estratificado por la localización.

- Localización superior izquierda. 57 implantes fueron depositados en esta localización. De estos, 46 contenían MSCs (24 OP, 21 OA). Se confirmó la presencia de formación de hueso en 2 (16,7%) de los implantes sin células y en 19 (41,3%) de los que sí contenían MSCs (9 (37,5%) OP y 10 (47,6%) OA).
- Localización superior derecha. 36 implantes fueron realizados en esta ubicación. De estos, 29 contenían MSCs (11 OP, 17 OA). Se evidenció la existencia de formación ósea en 1 (14,3%) de los implantes sin células frente a 10 (44,5%) de los que sí contenían MSCs (5 (45,5%) OP, 5 (29,4%) OA).

- Localización inferior. 44 implantes se ubicaron en esta localización. De estos, 30 contenían MSCs (12 OP, 18 OA).

Se observó formación ósea en 3 (27,4%) de los implantes sin MSCs frente a 18 (60%) de los que sí contenían células (7 (58,3% OP, 11 (61,1%) OA).

Las diferencias encontradas en la formación ósea en las distintas localizaciones no resultaron estadísticamente significativas.

	ISI			ISD			II		
	Total	0	1-4	Total	0	1-4	Total	0	1-4
Con células	45	26 (57,8%)	19 (42,2%)	28	18 (64,2%)	10 (35,7%)	30	12 (40%)	18 (60%)
• OA	21	11 (52,4%)	10 (47,6%)	17	12 (70,6%)	5 (29,4%)	18	7 (38,9%)	11 (61,1%)
• OP	24	15 (62,5%)	9 (37,5%)	11	6 (54,5%)	5 (45,5%)	12	5 (41,7%)	7 (58,3%)
Sin células	12	10 (83,3%)	2 (16,7 %)	7	6 (85,7%)	1 (14,3%)	14	11 (78,6%)	3 (27,4%)
BIOSS									
Con células	25	14 (56%)	10 (44%)	15	10 (67,7%)	5 (33,3%)	16	7 (43,8%)	9 (56,3%)
• OA	11	6 (54,5%)	5 (45,5%)	11	9 (81,8%)	2 (18,2%)	9	4 (44,4%)	5 (55,6%)
• OP	14	9 (64,3%)	5 (35,7%)	4	1 (25%)	3 (75%)	7	3 (42,9%)	4 (57,1%)
Sin células	3	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3	3 (100%)	0 (0%)	8	5 (62,5%)	3 (37,5%)
TCP									
Con células	9	5 (55,6%)	4 (44,4%)	5	3 (60%)	2 (40%)	3	2 (67,7%)	1 (33,3%)
• OA	2	1 (50%)	1 (50%)	3	3 (100%)	0 (0%)	1	0 (0%)	1 (100%)
• OP	7	4 (57,1%)	3 (42,9%)	2	0 (0%)	2 (100%)	2	2 (100%)	0 (0%)
Sin células	5	4 (80%)	1 (20%)	1	1 (100%)	0 (0%)	2	2 (100%)	0 (0%)
NUOSS									
Con células	4	2 (50%)	2 (50%)	4	3 (75%)	1 (25%)	5	2 (40%)	3 (60%)
• OA	4	2 (50%)	2 (50%)	2	1 (50%)	1 (50%)	3	1 (33,3%)	2 (67,7%)
• OP	0	0 (0%)	0 (0%)	2	2 (100%)	0 (0%)	2	1 (50%)	1 (50%)
Sin células	0	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	1 (100%)	3	3 (100%)	0 (0%)
CELLCERAM									
Con células	8	4 (50%)	4 (50%)	5	3 (60%)	2 (40%)	7	2 (28,6%)	5 (71,4%)
• OA	5	3 (60%)	2 (40%)	2	0 (0%)	2 (100%)	5	2 (40%)	3 (60%)

• OP	3	1 (33,3%)	2 (67,7%)	3	3 (100%)	0 (0%)	2	0 (0%)	2 (100%)
Sin células	3	3 (100%)	0 (0%)	1	1 (100%)	0 (0%)	1	1 (100%)	0 (0%)

Tabla 10 Porcentaje total de formación ósea según la localización de los implantes y estratificado en función del tipo de células.

### **Expresión de genes óseos**

Se estudió la expresión de varios genes característicos del linaje osteoblástico en 19 implantes con MSCs. De ellos, 10 contenían MSCs obtenidas de pacientes OP (edad media  $82 \pm 8$  años), mientras que los otros 9 contenían células de pacientes con OA (edad media  $73 \pm 8$  años). En todos estos implantes se había empleado como partícula el DBM1 (Bio-Oss).

Establecimos como punto de corte de la PCR cuantitativa un valor de Ct de 35, entendiendo como ausencia de expresión los casos con Ct igual o superior a 35 y como evidencia de expresión los casos con Ct inferior a 35.

El análisis mediante RT-PCR mostró expresión de COL1A1 (gen codificante de la cadena alfa del colágeno 1) en 8 de los 10 (80%) implantes con células de OP. De manera similar, se comprobó la expresión de COL1A1 en 8 de 9 (89%) implantes con células de OA ( $p=0,99$ ).

En el caso de ALPL (que codifica la fosfatasa alcalina), el análisis mostró su expresión en 2 de 10 (20%) implantes con MSCs de OP frente a 3 de 9 (33%) implantes de OA ( $p=0,629$ ).

La expresión de BGLAP (Bone Gla Protein, osteocalcina) se objetivó en 7 de 10 (70%) implantes con células de pacientes OP y en 6 de 9 (67%) implantes con células de OA ( $p=0,99$ ).

Por último, el análisis mediante RT-PCR mostró la expresión de IBSP (gen que codifica la sialoproteína) en 4 de 10 (40%) implantes que contenían MSCs de pacientes OP frente a 4 de 9 (44%) implantes con células de pacientes OA ( $p=0,99$ ).

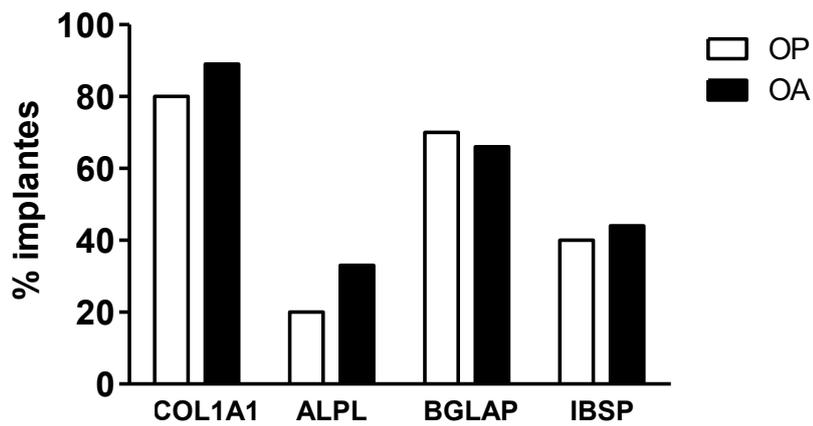


Figura 16. Expresión de distintos genes del linaje osteoblástico en implantes con MSCs de pacientes con OP y OA.

Al comparar los Cts de los 4 genes estudiados entre ambos grupos se encontraron Cts discretamente más bajos (indicativos de una cierta mayor abundancia de transcritos) en el grupo de OA, aunque estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

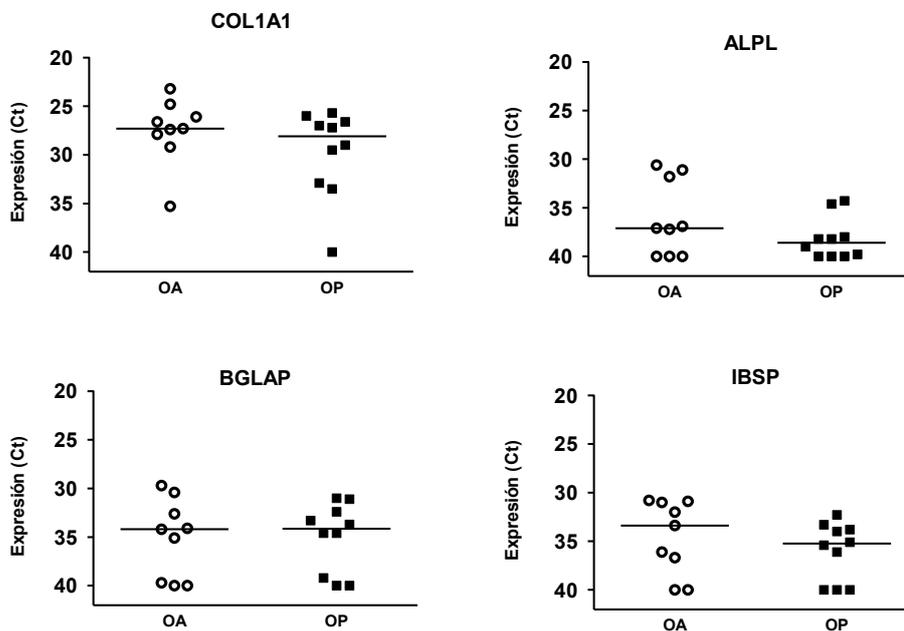


Figura 17. Expresión (Ct) de los genes estudiados en el grupo de OA y de OP (Cts más bajos indican mayor expresión).

Al normalizar la expresión génica en relación con el gen constitutivo (“housekeeping”) (GAPDH), parece ser discretamente más baja en el grupo de OP, pero

las diferencias entre grupos no resultaron estadísticamente significativas en ninguno de los 4 genes. Figura 18.

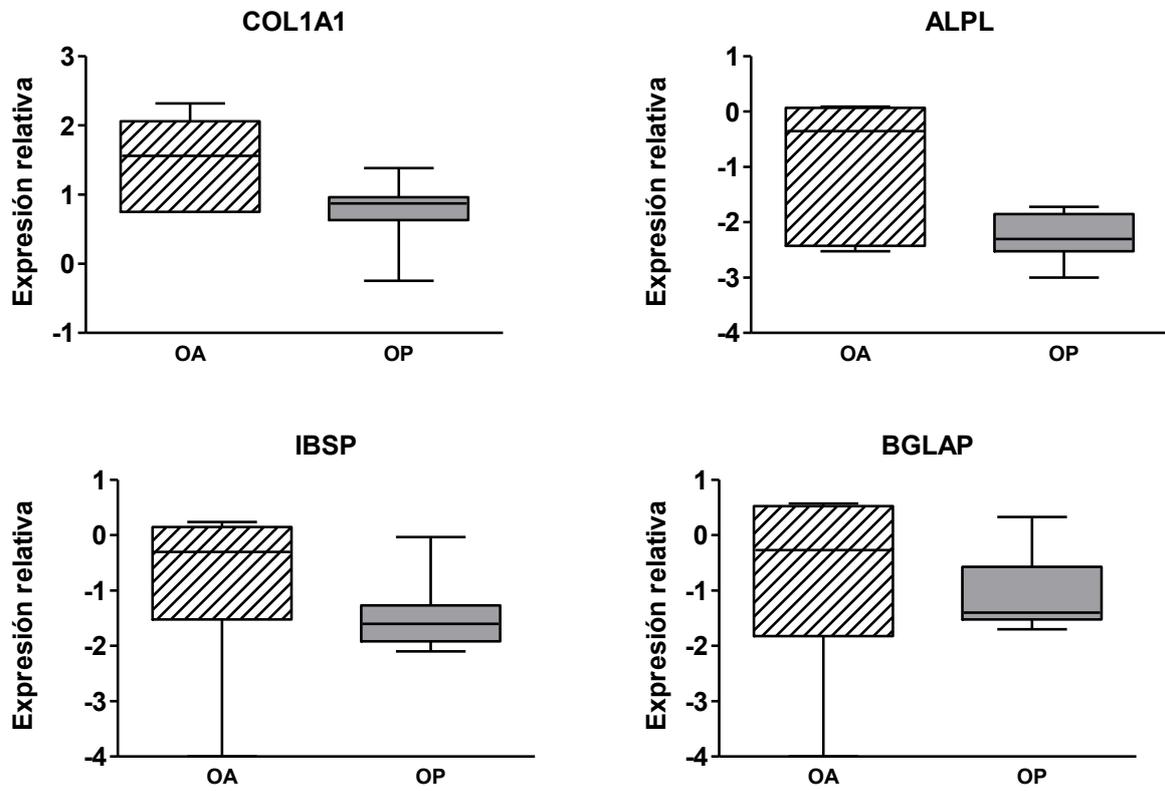


Figura 18. Expresión relativa de los genes osteogénicos en los grupos de OA y OP.

## 2. Estudio de Senescencia

Muchos de los genes SASP se expresaban a niveles bajos y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las MSCs de pacientes con OP respecto al grupo de OA. Sin embargo, algunos de los genes de transcripción asociados al SASP fueron algo más abundantes en los cultivos de células obtenidas de pacientes con OA.

Siguiendo esta línea, la expresión de los efectores de senescencia celular p16 y p21 fue similar entre ambos grupos. Asimismo, el análisis de expresión de galactosidasa asociada a la senescencia también fue similar entre ambos grupos (Figura 19).

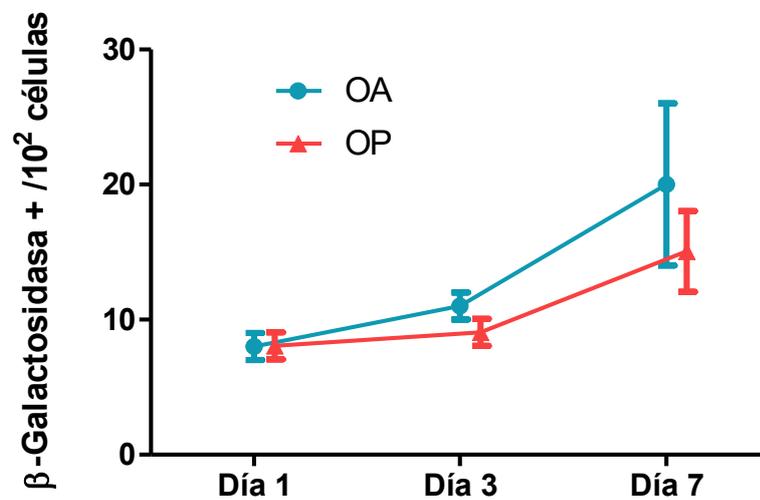


Figura 19. Beta-galactosidasa asociada a la senescencia. Proporción de células senescentes en cultivos de MSCs obtenidas de pacientes con OP (n=7) y de pacientes con OA (n= 8) mantenidas entre 1 y 7 días (media y error estándar).

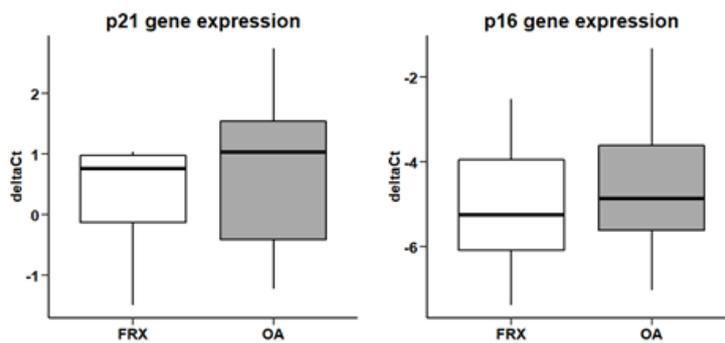
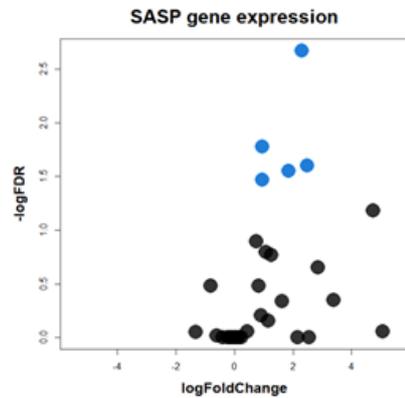
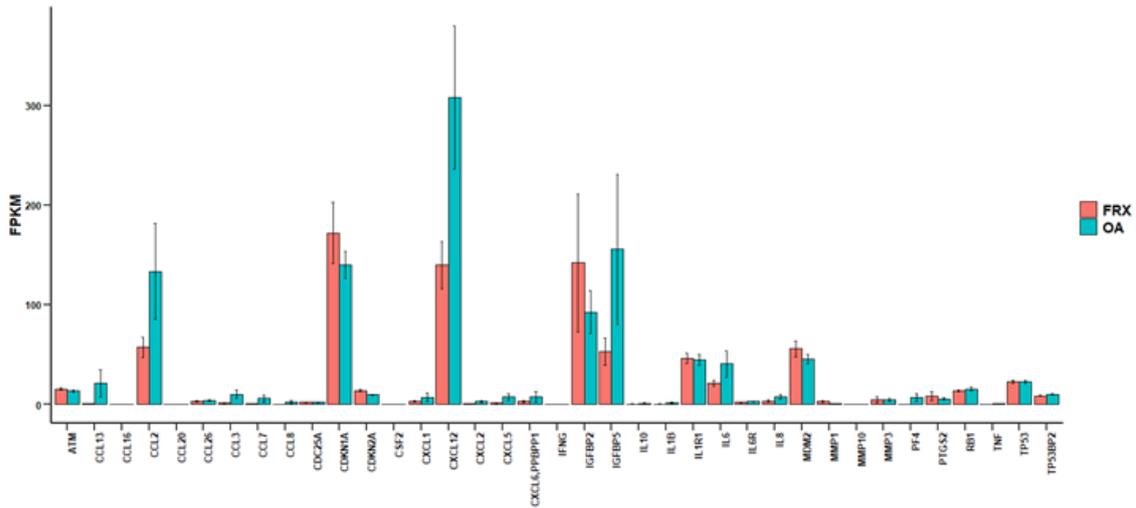


Figura 20. Expresión de genes asociados a la senescencia celular de MSCs de pacientes con OP y OA. Panel superior: Expresión normalizada de genes asociados a SASP en ambos grupos (eje Y muestra fragmentos por kilobase de transcrito por millón de secuencias mapeadas). Panel medio: Diagrama de volcán de resultados previos mostrando los cambios relativos de la expresión (“fold changes”) y valores  $p$  de genes de MSCs de OA en relación con OP (los puntos azules representan genes que presentaban una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos). Panel inferior: Expresión de p21 y p16 analizado mediante RT-qPCR.

### **3. Estudio del Modelo de ONM**

Tratamos de establecer un modelo de osteonecrosis maxilar en ratones sometidos a la extracción de una pieza dentaria y tratamiento con el bisfosfonato ácido zoledrónico en diversas pautas (Tabla 11).

A 16 ratones se les administraron entre 2 y 6 inyecciones de zoledrónico por vía intraperitoneal a intervalos semanales. A 3 de ellos se les administró además dexametasona retardada (dosis 10mg/kg, 3 veces por semana por vía subcutánea).

A otros 11 ratones se les administraron 2 inyecciones de zoledrónico por vía intravenosa con un intervalo de una semana. A 5 de ellos se les administró además dexametasona retardada (dosis 10mg/kg, 3 veces por semana por vía subcutánea).

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis de ácido zoledrónico (n)</b>	<b>Vía de administración de ácido zoledrónico</b>	<b>Tiempo de estudio (semanas desde extracción molar)</b>	<b>Ratones (n)</b>	<b>Osteonecrosis (n)</b>
Ácido Zoledrónico	5	ip	5	11	0
Ácido Zoledrónico	3	ip	3	3	0
Ácido Zoledrónico, dexametasona	3	ip.	3	2	0
Ácido Zoledrónico	2	iv	2	6	0
Ácido Zoledrónico, dexametasona	2	iv	2	5	1

Tabla 11. Distintas pautas de tratamiento administrados a los ratones buscando el desarrollo del modelo de ONM. ip= intraperitoneal, iv= intravenoso.

#### **Estudio radiológico**

A todos los ratones se les realizó un estudio radiológico mediante micro TC. En dicho estudio se evidenciaba la ausencia de 1 pieza molar, pero no se encontraron otras anomalías óseas.



Figura 21. Imágenes obtenidas mediante microTC en las que se observa la ausencia de una pieza dentaria.

Mediante micro TC medimos además la masa ósea para confirmar la bioactividad del ácido zoledrónico. Como era de esperar, el volumen del hueso trabecular se vio aumentado por la acción del zoledrónico tanto mediante administración intraperitoneal como intravenosa (de una media de  $30\pm 8\%$  a  $48\pm 10\%$  en fémur y  $32\pm 6\%$  a  $48\pm 12$  en tibia).

### Estudio histológico

Se realizó además un estudio histológico con tinción de Hematoxilina-eosina. Solo 1 de las 31 muestras analizadas evidenciaba hallazgos histológicos compatibles con osteonecrosis mandibular. En este caso el ratón había recibido 2 inyecciones de zoledrónico intravenoso y dexametasona.

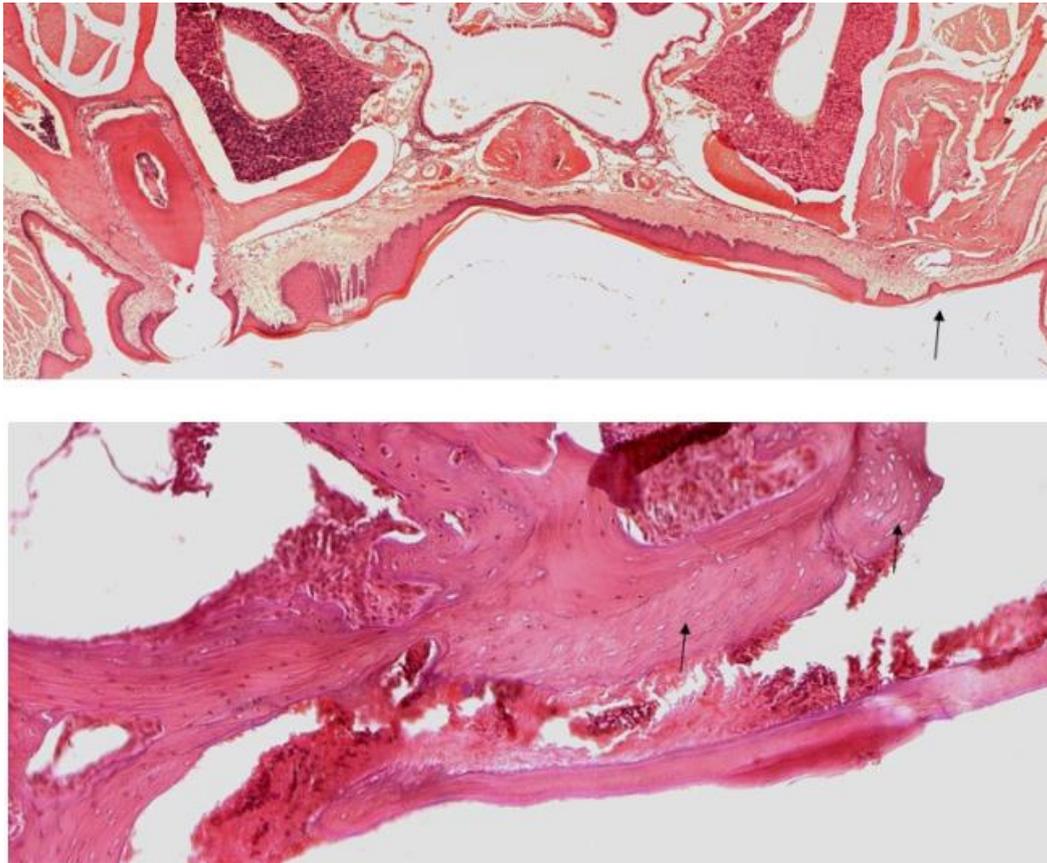


Figura 22. Imágenes de microscopía electrónica óptica en la que se evidencia lagunas de osteocitos vacías como hallazgo compatible con osteonecrosis.



# Discusión



## **DISCUSIÓN**

### **Osteoporosis y su tratamiento. Necesidad de aparición de nuevas terapias.**

La OP es una enfermedad caracterizada por una baja masa ósea y una alteración de la microarquitectura que conlleva un aumento de la fragilidad ósea y del riesgo de fractura<sup>86</sup>. Esto se produce por una falta de equilibrio entre los procesos de formación y de resorción ósea de manera que predomina la resorción sobre la formación. La OP es la enfermedad metabólica ósea más prevalente y se ha estimado que, en población blanca, en torno al 50% de las mujeres y el 20% de los hombres en la década de los 50 años tendrán una fractura por fragilidad a lo largo del resto de su vida<sup>91</sup>. Esto conlleva un gran impacto, tanto en morbi-mortalidad como en carga económica.

El hueso está en un continuo proceso de remodelado a través de la actividad de los osteoclastos y los osteoblastos, que sintetizan nuevo hueso para reemplazar el antiguo retirado por los osteoclastos. La formación de hueso depende, por tanto, de la proliferación y diferenciación de los precursores de osteoblastos en las zonas de remodelado óseo, así como de la actividad de los osteoblastos maduros que sintetizan y secretan los componentes de la matriz ósea. Los osteoblastos se originan a partir de las MSCs que también pueden diferenciarse a adipocitos, condrocitos y mioblastos<sup>5</sup>. Es necesario que la formación ósea mediada por osteoblastos compense la resorción mediada por osteoclastos. Un desequilibrio entre estas dos actividades con una formación de hueso insuficiente para regenerar el hueso destruido por los osteoclastos derivará en una masa ósea baja y, consecuentemente, en osteoporosis. Por lo tanto, una tasa de diferenciación suficiente de las MSCs a osteoblastos es crítica para mantener la masa ósea.

Además del papel que juegan en el remodelado óseo, los osteoblastos también son requeridos para la formación de hueso en situaciones en las que no ha habido resorción ósea por parte de los osteoclastos como, por ejemplo, durante el crecimiento del esqueleto o durante procesos de reparación de fracturas.

Podemos dividir los tratamientos para la OP entre anti-resortivos y osteoformadores en función del efecto que ejercen sobre el hueso. Los fármacos más

frecuentemente empleados son los anti-resortivos, entre los que encontramos los bisfosfonatos y los inhibidores de RANKL. Merece la pena mencionar que los agentes anti-resortivos disminuyen la resorción ósea pero también afectan a la formación del hueso. Aunque no parece que tengan un efecto inhibitorio directo sobre los osteoblastos, la inhibición de la resorción ósea va seguida de cierto descenso en la formación de hueso. Esto se debe al acoplamiento entre la resorción y la formación óseas. Este acoplamiento es un mecanismo que, en condiciones fisiológicas, ayuda a mantener el equilibrio entre ambas actividades a nivel local. Los bisfosfonatos son potentes agentes anti-osteoclasticos que reducen la resorción ósea y constituyen los fármacos más comúnmente usados en el tratamiento de la osteoporosis. Los bisfosfonatos aumentan la masa ósea y reducen el riesgo de fractura vertebral y periférica. Presentan un buen perfil de seguridad, aunque algunos pacientes pueden presentar efectos adversos a nivel del esqueleto, como osteonecrosis mandibular o fracturas femorales atípicas<sup>154 168</sup>. Afortunadamente, estas complicaciones son poco frecuentes (salvo cuando estos fármacos son empleados en pacientes oncológicos), pero pueden ser difíciles de tratar y causar importantes inconvenientes a los pacientes. La patogenia de estos efectos adversos no es bien conocida, pero está probablemente relacionada con la inhibición del remodelado óseo<sup>102</sup>. Complicaciones similares también han sido descritas en pacientes tratados con otros agentes anti-resortivos, como el denosumab (inhibidor del RANKL).

Las opciones terapéuticas osteoformadoras son más limitadas, ya que solo disponemos del anticuerpo monoclonal anti-esclerostina (romosozumab) y de análogos de la PTH (abaloparatida, teriparatida) y no todas están comercializadas en Europa. Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar nuevas terapias que estimulen la formación ósea. En teoría, un trasplante celular autólogo podría ser una estrategia atractiva en pacientes con OP, así como en pacientes con problemas en la consolidación de fracturas o con otros defectos óseos localizados. Aunque las terapias basadas en MSCs parecen prometedoras, sigue existiendo preocupación y dificultades en relación con su uso, por las limitaciones técnicas o las bajas tasas de supervivencia de las células trasplantadas. Esta tesis se basa principalmente en el estudio de la capacidad osteoformadora de MSCs de pacientes osteoporóticos.

## **MSCs**

Las MSCs son células adultas multipotentes que suelen encontrarse en un estado de quiescencia, pero, en respuesta a determinadas señales celulares, son capaces de diferenciarse a diversos tipos celulares como osteoblastos, condrocitos, adipocitos y miocitos. A lo largo de los últimos años, las MSCs han sido propuestas como candidatas para terapias celulares.

### **Lugar de obtención de MSCs (tejido adiposo vs médula ósea)**

Inicialmente, las MSCs fueron aisladas a partir de médula ósea, pero en la actualidad se sabe que pueden obtenerse de otros tejidos como el tejido adiposo, el cordón umbilical, la placenta o la pulpa dental<sup>5</sup>. Obtener MSCs a partir del tejido adiposo resulta especialmente interesante ya que, a diferencia de la médula ósea, la obtención es un procedimiento sencillo y permite conseguir una mayor cantidad de células. Las MSCs representan un porcentaje muy pequeño de las células de la médula ósea. Se ha descrito que este porcentaje resulta incluso menor en individuos de edad avanzada<sup>293</sup>. Sin embargo, existen estudios que sugieren que la capacidad de formación ósea de las MSCs obtenidas de tejido adiposo es menor que la de aquellas células procedentes de la médula ósea<sup>294</sup>. Las MSCs aisladas a partir de diferentes tejidos muestran diferencias en sus características biológicas, sus funciones paracrinas, su diferenciación, su desarrollo<sup>295 296 297 298</sup> y, por tanto, en su posible uso terapéutico. Las MSCs derivadas de la médula ósea parecen preferibles para la diferenciación osteogénica ya que parecen presentar una capacidad de diferenciación osteogénica mayor que la de las MSCs obtenidas a partir de tejido adiposo. En consecuencia, decidimos utilizar MSCs obtenidas de médula ósea para nuestros experimentos, aunque su obtención resultase más compleja.

## Uso terapéutico de MSCs

La capacidad de las MSCs de proliferar y diferenciarse hacia distintos tipos celulares, incluyendo osteoblastos, ha hecho que emerjan como una prometedora herramienta terapéutica. Además de su capacidad de dar lugar a células maduras, las MSCs poseen otras características interesantes, ya que son capaces de producir y secretar citoquinas y factores de crecimiento que pueden ejercer acciones anabólicas sobre los tejidos diana. Por tanto, las MSCs contribuyen a la regeneración de tejidos, no solo gracias a su capacidad pluripotente, sino además mediante la estimulación de células del huésped a través de mecanismos paracrinos.

El uso de MSCs en el tratamiento de patología ósea ha sido explorado en varios estudios preclínicos y en algunos ensayos clínicos (NCT02566655 and NCT01532076) con resultados aún pendientes o poco claros.

En modelos animales se ha descrito un aumento del hueso trabecular tras una inyección de MSCs en la médula ósea<sup>272 273</sup>. La administración local de MSCs también parece haber demostrado facilitar la consolidación de fracturas en estudios preclínicos<sup>299</sup>. En un estudio se describió una mejoría en la microarquitectura ósea y en el grosor trabecular tras una administración local de MSCs autólogas en un modelo de OP inducida por ovariectomía en conejos<sup>274</sup>. Algunos estudios han descrito que las MSCs de pacientes con OP tienen una capacidad osteogénica in vitro disminuida<sup>300 301</sup> pero otros no han confirmado esos resultados<sup>302</sup>. La capacidad osteogénica de MSCs de pacientes con OP no ha sido investigada lo suficiente. Las MSCs son hipoinmunogénicas porque expresan niveles bajos de antígenos de histocompatibilidad, por lo que en principio deben de plantear menos problemas de rechazo por parte del huésped. Sin embargo, en caso de utilizarse, sería preferible su uso en forma de autoinjertos en lugar de aloinjertos para eliminar así las preocupaciones acerca de una posible reacción inmune y otros riesgos asociados a los alo-trasplantes. Teniendo esto en cuenta, antes de emplear MSCs en el tratamiento de pacientes con OP habría que comprobar que la capacidad regenerativa de las MSCs de pacientes con OPs se encuentre conservada. Es importante dilucidar esta cuestión antes de plantear realizar trasplantes autólogos de MSCs con objetivos de regeneración en pacientes osteoporóticos.

En experimentos previos de nuestro laboratorio, pusimos de manifiesto que las MSCs de pacientes osteoporóticos mantenían la capacidad de proliferación, pero presentaban una menor capacidad de diferenciación in vitro<sup>221</sup>.

En este estudio, quisimos comparar la capacidad de formación ósea in vivo de MSCs obtenidas de pacientes con OP y de pacientes con OA. Al elegir un modelo animal sobre el que realizar el estudio de formación ósea in vivo, preferimos utilizar un modelo murino NOD SCID (desarrollo deficiente de linfocitos B y linfocitos T y en la función de las células Natural Killer<sup>284</sup>) para evitar así posibles reacciones del sistema inmunitario al realizarse el trasplante alogénico de MSCs.

Para entender mejor el potencial regenerativo de estas células, exploramos su estado de senescencia además su capacidad de formación ósea in vivo.

### **Formación de hueso**

La capacidad de formación de hueso in vivo de las MSCs fue evaluada trasplantando MSCs obtenidas de pacientes con OP y controles con OA junto con distintos tipos de partículas al tejido subcutáneo de ratones inmunodeprimidos. Tras 12 semanas se procedió al estudio de los implantes. El estudio se basó en el análisis histológico y en el estudio de expresión de genes característicos del linaje osteoblástico.

Escogimos realizar el estudio mediante valoración de la formación ectópica de hueso en el tejido celular subcutáneo. Los modelos de formación ósea ectópica reducen el número de variables que influyen en la osteogénesis por parte del animal al reducir los efectos de citoquinas, células formadoras, células madre endógenas y estímulos mecánicos. Existen diferentes modelos para estudiar la formación ósea ectópica, incluyendo la implantación en el tejido celular subcutáneo, intramuscular o en la cápsula renal<sup>303</sup>. Entre estos, escogimos realizar los implantes a nivel subcutáneo ya que supone el procedimiento técnico más sencillo. Además, consideramos que la falta de células óseas progenitoras propias del animal en el tejido celular subcutáneo (a diferencia del músculo) supone una ventaja ya que, en teoría, asegura que el nuevo hueso formado es de origen exógeno. Sin embargo, hay estudios que sugieren que la capacidad de formación de hueso en el tejido subcutáneo es menor que en otras localizaciones como a nivel intramuscular, posiblemente debido a la menor vascularización<sup>304 305</sup>.

El análisis histológico de los implantes subcutáneos no mostró diferencias significativas en la capacidad de osteogénesis entre el grupo OP y el grupo control independientemente de si se realizó un análisis dicotómico o semicuantitativo. En la línea de ese resultado, los genes codificantes de proteínas relacionadas con la osteogénesis presentaban niveles similares de expresión en los implantes con MSCs de pacientes OP que en las de pacientes OA. El colágeno tipo I es la proteína con mayor presencia en la matriz ósea representando el 90% del componente orgánico de la misma. Como era de esperar, el colágeno tipo 1 fue el gen más expresado entre los 4 genes estudiados.

En conjunto, nuestros resultados muestran que las MSCs de pacientes de edad avanzada con fracturas de cadera osteoporóticas conservan la capacidad de osteogénesis in vivo de manera similar a los pacientes de edad avanzada con OA.

### **Partículas**

Los materiales empleados para injertos óseos pueden dividirse entre los injertos óseos naturales y los sintéticos. Para el estudio de la formación ósea in vivo utilizamos 4 tipos diferentes de partículas como andamiaje de las MSCs (fósforo tricálcico (TCP, Sigma Aldrich, St Louis, USA), una mezcla de hidroxapatita y fosfato tricálcico (CELLCERAM, Scaffdex CellCeram™, Tampere, Finlandia) y dos preparaciones de granulado óseo desvitalizado (demineralized bone matrix, DBM) (DBM1, BIO-OSS, Geistlich Bio-Oss Spongiosa, New Jersey, USA; DBM2, NUOSS, Ace surgical, USA). La naturaleza y la calidad de estas partículas influyen en la actividad osteogénica de las células trasplantadas<sup>306 303</sup>. Se cree que la cantidad y la calidad del hueso formado a partir de MSCs está influenciado por el andamiaje sobre el que se realice el trasplante. El rendimiento osteogénico depende de diversas capacidades de las partículas, la capacidad de osteoinducción (iniciación de la diferenciación de MSCs hacia osteoblastos) y osteoconducción (facilitación del paso de células y nutrientes a través de una estructura porosa tridimensional).

Aunque no era nuestro objetivo y el estudio no estaba diseñado para realizar comparaciones entre los distintos materiales, no encontramos diferencias significativas entre los 4 tipos de partículas empleadas.

## Senescencia

Los procesos de senescencia se están revelando como muy importantes en la homeostasis de muchos tejidos y, en consecuencia, se cree que participan en los mecanismos patogénicos de diferentes enfermedades, y en particular de las asociadas al envejecimiento. Las células senescentes tienen un fenotipo característico que incluye la secreción de una serie de factores que pueden tener efectos paracrinos sobre las células circundantes no senescentes; es el llamado “Senescence-Associated Secretory Phenotype” o SASP. En las MSCs de este estudio, muchos genes integrantes del SASP se expresaban a niveles bajos y no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las MSCs de pacientes con OP y de los controles con OA. Sin embargo, alguno de los transcritos asociados al SASP eran algo más abundantes en los cultivos celulares obtenidos de pacientes con OA. En esta misma línea, la expresión de los efectores de senescencia celular p16 y p21 fue similar en ambos grupos, así como el análisis de expresión de la galactosidasa, ampliamente utilizada como marcador final de la senescencia celular.

En conjunto, nuestros resultados muestran que las MSCs de pacientes con OP tienen una capacidad de formación ósea *in vivo* y un estado de senescencia similar al de las MSCs de pacientes con OA, que habitualmente no tienen OP ni baja masa ósea<sup>307 308</sup>. Al ser todos los sujetos de edad avanzada y al no haber incluido un grupo control de individuos jóvenes, nuestros datos no nos permiten establecer si la capacidad osteogénica se encontraba disminuida en comparación con sujetos jóvenes. Cabe mencionar que las MSCs obtenidas de individuos con OP y con OA mostraban una capacidad osteogénica similar, a pesar de que los pacientes con OP eran de mayor edad que los del grupo control (reflejando la epidemiología de las fracturas de cadera y la OA).

Se ha descrito que la senescencia celular y la insuficiencia de las células progenitoras son sellos de identidad del envejecimiento<sup>309</sup> y que, por tanto, las MSCs de individuos de edad avanzada podrían tener reducida su capacidad de diferenciación a osteoblastos<sup>310 311</sup>. En nuestro estudio, no encontramos claras diferencias relacionadas con la edad en la capacidad osteogénica de las MSCs. Esto resulta contradictorio con los resultados de otros estudios y, quizás podría explicarse por el relativamente estrecho rango de edad de los sujetos incluidos en nuestro estudio. También habría que tener en

cuenta que el envejecimiento puede alterar de manera selectiva las funciones de las células progenitoras. Por ejemplo, Beane et al<sup>312</sup> aisló MSCs de médula ósea, músculo y tejido adiposo de ratones jóvenes y de edad avanzada. Mostraron que la edad redujo el rendimiento celular general y el potencial adipogénico en todas las poblaciones, mientras que la osteogénesis y la clonogenicidad no presentaron cambios.

Considerábamos que era importante estudiar el estado de senescencia de las MSCs ya que existen datos que sugieren que este mecanismo está implicado en el desarrollo de diferentes enfermedades asociadas a la edad, incluyendo la OP<sup>239</sup>. En consonancia con su capacidad preservada para la formación ósea, no encontramos evidencia de un aumento de senescencia en las MSCs obtenidas de pacientes con OP respecto a las células obtenidas de los controles con OA. Sería más relevante realizar un análisis de senescencia en muestras de tejido óseo, pero esto resulta inviable debido a la pequeña proporción de MSCs en las biopsias óseas. Debido a la ausencia de sujetos jóvenes sanos en el estudio, estos resultados no pueden entenderse como evidencia en contra del papel que juega la senescencia celular en trastornos del esqueleto asociados a la edad. De hecho, estudios recientes han demostrado un aumento en la fracción de osteocitos senescentes en ratones viejos<sup>313</sup> y se está explorando el potencial uso de agentes dirigidos a la senescencia celular como potenciales nuevos tratamientos frente a la osteoporosis y otras enfermedades del esqueleto<sup>314 315 316</sup>.

Cabe mencionar que, a pesar de que el nivel de expresión de los genes asociados a SASP era similar en ambos grupos, no podemos excluir diferencias en las modificaciones post-traslacionales que podrían ser relevantes en la biología del hueso. Esto podría ser relevante para explicar la actividad reducida de la fosfatasa alcalina en la mineralización in vitro, a pesar de los niveles normales de expresión de genes encontrados previamente in vitro (datos no publicados) y en el estudio actual in vitro.

### **Osteonecrosis maxilar (ONM)**

Los bisfosfonatos son los anti-resortivos más empleados en el tratamiento de la OP y de ciertos tumores. La ONM es una complicación poco frecuente de estos fármacos, pero es potencialmente grave y de manejo complicado. Al igual que ocurre en otros

trastornos complejos, la ONM parece ser el resultado de una combinación de factores genéticos y ambientales. Existen algunos factores ambientales bien establecidos, como la extracción dental previa y el tipo y la forma de administración de los bisfosfonatos (con diferencias en función del tipo y de la vía de administración). Se considera que los procesos infecciosos locales y la respuesta inmune también forman parte de la patogenia de la ONM. Diferentes estudios han propuesto un potencial papel de los linfocitos T  $\gamma\delta$  en el desarrollo de ONM<sup>291</sup>, así como de los neutrófilos y macrófagos y de las interleuquinas y otras proteínas producidas por células del sistema inmune<sup>317</sup>.

En los últimos años se ha propuesto la posibilidad de emplear MSCs como tratamiento para diferentes patologías, incluyendo la ONM. Varios estudios han explorado los efectos de la administración de MSCs en modelos animales de ONM con resultados beneficiosos<sup>318 319</sup>. Nuestro objetivo era comprobar si estos efectos positivos se mantenían al utilizar MSCs obtenidas de pacientes osteoporóticos.

A pesar de que las MSCs son hipoinmunogénicas, quisimos desarrollar un modelo de ratón inmunodeprimido con ONM para estudiar el posible efecto beneficioso de la administración sistémica de estas células eliminando la preocupación acerca de potenciales efectos adversos inmunológicos. Para ello, utilizamos ratones NOD.CB17-Prkdcscid/J que, como ya hemos reflejado, se caracterizan por presentar una inmunodeficiencia combinada severa, ya que tienen un defecto en el desarrollo de linfocitos B y linfocitos T, así como una función deficiente de las células natural killer.

A pesar de que a estos ratones se les extrajo un molar y se les administró zoledrónico +/- dexametasona, solo 1 de los 27 ratones empleados desarrolló hallazgos histológicos compatibles con ONM. Este resultado contrasta con el 45-50% de ONM que se describe en estudios con una metodología similar en ratones inmunocompetentes<sup>318 320</sup>.

A diferencia de los ratones inmunocompetentes, parece que los ratones inmunodeprimidos tienden a no desarrollar ONM, incluso tras un insulto a la mucosa oral junto con dosis altas de bifosfonatos y corticoides. Esto podría deberse a la propia deficiencia inmune o a las condiciones de esterilidad en la que se mantienen, con la consiguiente ausencia de flora bacteriana que favorezca la aparición de esta complicación. Por otro lado, estos resultados refuerzan la hipótesis de que las

condiciones endógenas desempeñan un importante papel en la aparición de ONM tras el tratamiento con bisfosfonatos.

Al no haberse conseguido el desarrollo de un modelo de ONM en un ratón inmunodeprimido, no pudimos explorar los resultados de la administración de MSCs de pacientes osteoporóticos.

### **Limitaciones del estudio**

Para estudiar la capacidad de formación de hueso de las MSCs de pacientes osteoporóticos en un modelo animal, por motivos prácticos y éticos, utilizamos MSCs obtenidas durante intervenciones quirúrgicas tras fracturas de cadera. Durante el proceso de obtención de MSCs, extraíamos cilindros óseos de la región central de la cabeza femoral evitando las zonas de fractura. Falster et al<sup>321</sup> compararon la capacidad de proliferación y de diferenciación osteogénica in vitro entre MSCs obtenidas en zonas que habían recibido un traumatismo y MSCs de zonas atraumáticas y no encontraron diferencias entre ambos grupos. A pesar de esto, no podemos asegurar que no existan factores relacionados con la fractura que puedan tener algún efecto sobre las propiedades de las MSCs ya que otros estudios sugieren que estas regiones tienen una mayor probabilidad de tener MSCs peculiares<sup>322</sup>.

Por motivos éticos y pragmáticos, y de manera similar a otros estudios publicados<sup>323 324 325 326</sup>, para comparar la capacidad osteogénica de las MSCs de pacientes osteoporóticos, utilizamos como controles las MSCs de pacientes con artrosis a los que se les había realizado un reemplazo de cadera. Aunque lo ideal habría sido obtener las MSCs de controles sanos, se optó por utilizar MSCs de los pacientes con artrosis ya que lo contrario supondría someter a individuos sanos a un procedimiento invasivo no exento de posibles efectos secundarios. En algunos estudios se ha descrito una reducción la capacidad de proliferación de las MSCs y en la mineralización ósea en pacientes con OA <sup>322 327 328</sup>. Sin embargo, otros autores no han encontrado diferencias en la capacidad osteogénica in vitro entre MSCs de pacientes con OA y controles sanos<sup>321</sup>. La ausencia de diferencias in-vitro podría implicar que la menor mineralización ósea en pacientes con OA se deba en parte al entorno inflamatorio local in vivo. Estas

alteraciones parecen revertir cuando las MSCs se introducen en un medio de cultivo estándar. Por tanto, estimamos que las MSCs de pacientes con OA podrían ser consideradas buenos controles para comparar las MSCs de pacientes con OP.

La formación ósea in vivo a partir de MSCs en un modelo murino se evaluó mediante análisis histológico de los implantes subcutáneos. La tinción de von Kossa es el “gold standard” para mostrar la calcificación de la matriz ósea en muestras histológicas. Sin embargo, la tinción de von Kossa requiere de incrustación en plástico de la muestra y de un microtomo específico del que no disponíamos. Por tanto, utilizamos la tinción del Tricrómico de Masson en muestras decalcificadas que es el procedimiento más común en este tipo de experimentos acerca de la formación de hueso ectópico.

La angiogénesis contribuye a la progresión de la osteogénesis y está asociada con una regeneración ósea eficaz<sup>329</sup>. Existen estudios que sugieren que las MSCs contribuyen a la regeneración tisular a través de mecanismos paracrinos además su multipotencia. Se ha descrito que la producción de exosomas por las MSCs juega un papel importante en la regeneración ósea a través del estímulo de la angiogénesis<sup>11</sup>. La osteogénesis está íntimamente relacionada a la angiogénesis y es necesaria una vascularización suficiente para que se produzca la formación ósea<sup>330</sup>. Por tanto, valorar la angiogénesis además de la formación de hueso ectópico podría aportar una visión más completa acerca del proceso de osteogénesis a partir de MSCs.

El cultivo in vitro prolongado induce cambios epigenéticos y modificaciones en el fenotipo de muchas células, incluyendo las MSCs<sup>331 332 333</sup>. Aunque solo utilizamos células de los primeros pases, no podemos excluir por completo la posibilidad de que el cultivo haya tenido algún tipo de impacto en el comportamiento celular. En cualquier caso, independientemente del tipo de impacto, debería haber afectado de manera similar a las células de ambos grupos. Las MSCs representan una proporción muy pequeña de las células de la médula ósea (0.01-0.001%)<sup>334</sup>. Por tanto, desde el punto de vista de la terapia celular parece que el cultivo ex vivo resulta inevitable.

### **Aportaciones de esta tesis y perspectivas futuras**

La OP es una enfermedad prevalente y sus consecuencias producen un importante impacto en la calidad de vida de los pacientes y suponen una carga al sistema de salud. Aunque las terapias disponibles disminuyen el riesgo de fractura existe un interés en el desarrollo de nuevas terapias. Nuevas terapias, como las basadas en MSCs, podría ser muy útiles para manejar casos difíciles de OP y algunas complicaciones de los tratamientos anti-resortivos como la osteonecrosis del maxilar, así como en otras alteraciones locales del esqueleto, como los defectos óseos tras resección quirúrgica y los retrasos en la consolidación de fracturas.

Nuestros resultados apoyan que la capacidad de osteogénesis in vivo de las MSCs de pacientes osteoporóticos no es menor que la de controles con OA. Esto apoyaría la elaboración de estudios futuros para evaluar su uso potencial en procesos de regeneración ósea.



# Conclusiones



## **CONCLUSIONES**

1. Las células troncales mesenquimales de la médula ósea de pacientes con fracturas osteoporóticas de cadera tienen una capacidad de formación de hueso en vivo similar a las de los controles de la misma edad con artrosis de cadera.
2. En línea con lo anterior, los marcadores de senescencia y los componentes del “fenotipo secretor asociado a senescencia” fueron similares en las células de los pacientes con osteoporosis y con artrosis.
3. No obstante, no todas las líneas celulares mostraron una capacidad adecuada de formación de hueso nuevo en vivo, lo que puede estar en relación con un defecto asociado a la edad avanzada de los donantes, pacientes con osteoporosis y controles con artrosis.
4. Los materiales utilizados como andamiaje pueden tener una influencia importante en la osteogénesis. Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias en la capacidad de inducción de formación ósea entre las distintas partículas utilizadas (TCP, CELLCERAM, BIO-OSS y NUOSS).
5. Los ratones inmunodeprimidos tienden a no desarrollar osteonecrosis de los maxilares, incluso tras una lesión de la mucosa oral y la administración de dosis altas de bifosfonatos y corticoides. Ello nos ha impedido establecer un modelo experimental para evaluar el potencial regenerativo de las células mesenquimales en esta condición.
6. Globalmente, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las células mesenquimales de los pacientes con osteoporosis conservan la capacidad de formación ósea de manera similar a otros individuos de su misma edad. Esto apoyaría la elaboración de estudios futuros para evaluar su uso potencial en procesos de regeneración ósea.



# Bibliografía

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Lian, J., Metabolism, G. S.-D. of B. and C. & 2006, undefined. The cells of bone. *books.google.com*.
2. Viguier-Carrin, S., Garnero, P. & Delmas, P. D. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* **17**, 319–36 (2006).
3. Grynopas, M. D. & Omelon, S. Transient precursor strategy or very small biological apatite crystals? *Bone* **41**, 162–4 (2007).
4. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. & Lalykina, K. S. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. *Cell Prolif* **3**, 393–403 (1970).
5. Mosna, F., Sensebé, L. & Krampera, M. Human Bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells: A User's Guide. *Stem Cells Dev* **19**, 1449–1470 (2010).
6. Abdallah, B. M. & Kassem, M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives. *J Cell Physiol* **218**, 9–12 (2009).
7. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science (1979)* **284**, 143–147 (1999).
8. Oliveira, R. L., Chagastelles, P. C., Sesterheim, P. & Pranke, P. In Vivo Immunogenic Response to Allogeneic Mesenchymal Stem Cells and the Role of Preactivated Mesenchymal Stem Cells Cotransplanted with Allogeneic Islets. *Stem Cells Int* **2017**, (2017).
9. Perez-Campo, F. & Riancho, J. Epigenetic Mechanisms Regulating Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Curr Genomics* **16**, 368–383 (2015).
10. Linero, I. & Chaparro, O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One* **9**, (2014).
11. Takeuchi, R., Katagiri, W., Endo, S. & Kobayashi, T. Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis. *PLoS One* **14**, e0225472 (2019).
12. Zhao, P., Xiao, L., Peng, J., Qian, Y.-Q. & Huang, C.-C. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells improve osteoporosis through promoting osteoblast proliferation via MAPK pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **22**, 3962–3970 (2018).
13. Gong, M. *et al.* Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. *Oncotarget* **8**, 45200–45212 (2017).
14. Otto, F. *et al.* Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765–771 (1997).
15. Maruyama, Z. *et al.* Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Developmental Dynamics* **236**, 1876–1890 (2007).

16. Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by runx2. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 658 43–49 (2010).
17. Mundlos, S. Cleidocranial dysplasia: Clinical and molecular genetics. *Journal of Medical Genetics* vol. 36 177–182 Preprint at <https://doi.org/10.1136/jmg.36.3.177> (1999).
18. Lian, J. B. *et al.* Regulatory Controls for Osteoblast Growth and Differentiation: Role of Runx/Cbfa/AML Factors. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* vol. 14 1–41 Preprint at <https://doi.org/10.1615/critreveukaryotgeneexpr.v14.i12.10> (2004).
19. Kern, B., Shen, J., Starbuck, M. & Karsenty, G. Cbfa1 Contributes to the Osteoblast-specific Expression of type I collagen Genes. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 7101–7107 (2001).
20. Nakashima, K. *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**, 17–29 (2002).
21. Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of Cellular Biochemistry* vol. 99 1233–1239 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jcb.20958> (2006).
22. Chen, D. *et al.* Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *Journal of Cell Biology* **142**, 295–305 (1998).
23. Lee, K.-S. *et al.* Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor beta 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12. *Mol Cell Biol* **20**, 8783–8792 (2000).
24. Javed, A. *et al.* Structural coupling of Smad and Runx2 for execution of the BMP2 osteogenic signal. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 8412–8422 (2008).
25. Celil, A. B., Hollinger, J. O. & Campbell, P. G. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J Cell Biochem* **95**, 518–528 (2005).
26. Chen, G., Deng, C. & Li, Y. P. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International Journal of Biological Sciences* vol. 8 272–288 Preprint at <https://doi.org/10.7150/ijbs.2929> (2012).
27. Wodarz, A. & Nusse, R. MECHANISMS OF WNT SIGNALING IN DEVELOPMENT. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 59–88 (1998).
28. Miller, J. R. The Wnts. *Genome Biology* vol. 3 Preprint at <https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-reviews3001> (2002).
29. Clevers, H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* vol. 127 469–480 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018> (2006).
30. Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L. & Yang, Y. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* **8**, 739–750 (2005).

31. Liang, H. D., Yu, F., Lv, P., Zhao, Z. N. & Tong, Z. H. Role of sost in wnt signal pathway in osteoporosis rats and regulating effect of soybean isoflavones on wnt signal pathway. *Mol Biol Rep* **41**, 4447–4454 (2014).
32. VAN BUCHEM, F. S., HADDERS, H. N. & UBBENS, R. An uncommon familial systemic disease of the skeleton: hyperostosis corticalis generalisata familiaris. *Acta radiol* **44**, 109–20 (1955).
33. Van Lierop, A. H. *et al.* Van Buchem disease: Clinical, biochemical, and densitometric features of patients and disease carriers. *Journal of Bone and Mineral Research* **28**, 848–854 (2013).
34. Niehrs, C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* vol. 25 7469–7481 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210054> (2006).
35. Morvan, F. *et al.* Deletion of a Single Allele of the Dkk1 Gene Leads to an Increase in Bone Formation and Bone Mass. *Journal of Bone and Mineral Research* **21**, 934–945 (2006).
36. Li, J. *et al.* Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* **39**, 754–766 (2006).
37. Velasco, J. & Riancho, J. A. La vía Wnt y el hueso. *Revista Espanola de Enfermedades Metabolicas Oseas* vol. 17 5–9 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S1132-8460\(08\)71131-0](https://doi.org/10.1016/S1132-8460(08)71131-0) (2008).
38. Shimoyama, A. *et al.* Ihh/Gli2 signaling promotes osteoblast differentiation by regulating Runx2 expression and function. *Mol Biol Cell* **18**, 2411–2418 (2007).
39. St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. & McMahon, A. P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* **13**, 2072–2086 (1999).
40. Hilton, M. J. *et al.* Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med* **14**, 306–314 (2008).
41. Kim, H. J. *et al.* The protein kinase C pathway plays a central role in the fibroblast growth factor-stimulated expression and transactivation activity of Runx2. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 319–326 (2003).
42. Krishnan, V. *et al.* Parathyroid Hormone Bone Anabolic Action Requires Cbfa1/Runx2-Dependent Signaling. *Molecular Endocrinology* **17**, 423–435 (2003).
43. van der Horst, G., Farih-Sips, H., Löwik, C. W. & Karperien, M. Multiple Mechanisms Are Involved in Inhibition of Osteoblast Differentiation by PTHrP and PTH in KS483 Cells. *Journal of Bone and Mineral Research* **20**, 2233–2244 (2005).
44. Menuki, K. *et al.* Climbing exercise enhances osteoblast differentiation and inhibits adipogenic differentiation with high expression of PTH/PTHrP receptor in bone marrow cells. *Bone* **43**, 613–620 (2008).
45. Marędziak, M., Mieszek, A., Chrzęstek, K., Basinska, K. & Marycz, K. Physical Activity Increases the Total Number of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells,

- Enhances Their Osteogenic Potential, and Inhibits Their Adipogenic Properties. *Stem Cells Int* **2015**, (2015).
46. Biol, T. J., Demiray, L. & Özçivici, E. Turkish Journal of Biology Bone marrow stem cells adapt to low-magnitude vibrations by altering their cytoskeleton during quiescence and osteogenesis. doi:10.3906/biy-1404-35.
  47. Baskan, O., Mese, G. & Ozcivici, E. Low-intensity vibrations normalize adipogenesis-induced morphological and molecular changes of adult mesenchymal stem cells. *Proc Inst Mech Eng H* **231**, 160–168 (2017).
  48. Hu, L. *et al.* Response and adaptation of bone cells to simulated microgravity. *Acta Astronaut* **104**, 396–408 (2014).
  49. Arfat, Y. *et al.* Physiological effects of microgravity on bone cells. *Calcif Tissue Int* **94**, 569–579 (2014).
  50. Zhuang, H. *et al.* Molecular Mechanisms of PPAR- $\gamma$ ; Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther* **11**, 255–264 (2016).
  51. Spatz, J. M. *et al.* Serum sclerostin increases in healthy adult men during bed rest. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97**, (2012).
  52. Parhami, F. *et al.* Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**, 182–188 (2001).
  53. da Silva, S. V., Renovato-Martins, M., Ribeiro-Pereira, C., Citelli, M. & Barja-Fidalgo, C. Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis. *Obesity* **24**, 2522–2532 (2016).
  54. Collins, F. L., Rios-Arce, N. D., Schepper, J. D., Parameswaran, N. & McCabe, L. R. The Potential of Probiotics as a Therapy for Osteoporosis. *Microbiol Spectr* **5**, (2017).
  55. Manolagas, S. C. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis\*. *Endocr Rev* **21**, 115–137 (2000).
  56. Franz-Odenaal, T. A., Hall, B. K. & Witten, P. E. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics* vol. 235 176–190 Preprint at <https://doi.org/10.1002/dvdy.20603> (2006).
  57. Marotti, G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Ital J Anat Embryol* **101**, 25–79.
  58. Palumbo, C., Palazzini, S., Zaffe, D. & Marotti, G. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: An ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. *Acta Anat (Basel)* **137**, 350–358 (1990).
  59. Simonet, W. S. *et al.* Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309–319 (1997).
  60. Brunkow, M. E. *et al.* Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* **68**, 577–589 (2001).

61. Verborgt, O., Gibson, G. J. & Schaffler, M. B. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research* **15**, 60–67 (2000).
62. Tresguerres, F. G. F. *et al.* The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 151422 (2019) doi:10.1016/j.aanat.2019.151422.
63. Bergwitz, C. & Jüppner, H. Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med* **61**, 91–104 (2010).
64. ROODMAN, G. D. Advances in Bone Biology: The Osteoclast\*. *Endocr Rev* **17**, 308–332 (1996).
65. Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. OC differentiation fonction.pdf. **423**, 337–342 (2003).
66. Han, Y., You, X., Xing, W., Zhang, Z. & Zou, W. Paracrine and endocrine actions of bone - The functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Research* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0019-6> (2018).
67. Nakamura, I., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N. & Suda, T. Regulation of osteoclast function. *Mod Rheumatol* **22**, 167–77 (2012).
68. Pagani, F., Francucci, C. M. & Moro, L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *J Endocrinol Invest* **28**, 8–13 (2005).
69. Guañabens, N., Peris, P. & Monegal, A. Bone Turnover Markers: A Clinical Review. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* vol. 13 83–97 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12018-015-9185-x> (2015).
70. Marsell, R. & Einhorn, T. A. The biology of fracture healing. *Injury* **42**, 551–555 (2011).
71. Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T. & Einhorn, T. A. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* **88**, 873–884 (2003).
72. Granero-Moltó, F. *et al.* Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* **27**, 1887–98 (2009).
73. Schipani, E. Hypoxia and HIF-1alpha in chondrogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 539–546 (2005).
74. Kon, T. *et al.* Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* **16**, 1004–14 (2001).
75. Gómez-Barrena, E. *et al.* Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone* vol. 70 93–101 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.07.033> (2015).
76. Mills, L. A. & Simpson, A. H. R. W. The relative incidence of fracture non-union in the Scottish population (5.17 million): A 5-year epidemiological study. *BMJ Open* **3**, (2013).

77. Ekegren, C. L., Edwards, E. R., de Steiger, R. & Gabbe, B. J. Incidence, costs and predictors of non-union, delayed union and mal-union following long bone fracture. *Int J Environ Res Public Health* **15**, (2018).
78. Tzioupis, C. & Giannoudis, P. V. Prevalence of long-bone non-unions. *Injury* **38**, S3–S9 (2007).
79. Mills, L. A., Aitken, S. A. & Simpson, A. H. R. W. The risk of non-union per fracture: current myths and revised figures from a population of over 4 million adults. *Acta Orthop* **88**, 434–439 (2017).
80. Zura, R. *et al.* Epidemiology of fracture nonunion in 18 human bones. *JAMA Surg* **151**, (2016).
81. Kwiatkowski, T. C., Hanley, E. N. & Ramp, W. K. Cigarette smoking and its orthopedic consequences. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* **25**, 590–7 (1996).
82. Murray, I. R., Foster, C. J., Eros, A. & Robinson, C. M. Risk factors for nonunion after nonoperative treatment of displaced midshaft fractures of the clavicle. *J Bone Joint Surg Am* **95**, 1153–8 (2013).
83. Jee, W. S., Park, H. Z., Roberts, W. E. & Kenner, G. H. Corticosteroid and bone. *Am J Anat* **129**, 477–9 (1970).
84. Molvik, H. & Khan, W. Bisphosphonates and their influence on fracture healing: a systematic review. *Osteoporosis International* vol. 26 1251–1260 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00198-014-3007-8> (2015).
85. Li, Y. T., Cai, H. F. & Zhang, Z. L. Timing of the initiation of bisphosphonates after surgery for fracture healing: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoporosis International* **26**, 431–441 (2014).
86. Cummings, S. R. & Melton, L. J. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* **359**, 1761–7 (2002).
87. Lorentzon, M. & Cummings, S. R. Osteoporosis: The evolution of a diagnosis. *J Intern Med* **277**, 650–661 (2015).
88. Kanis, J. A. *et al.* A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone* **42**, 467–475 (2008).
89. Blake, G. M. & Fogelman, I. Role of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in the Diagnosis and Treatment of Osteoporosis. *Journal of Clinical Densitometry* vol. 10 102–110 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2006.11.001> (2007).
90. Kanis, J. A. *et al.* A meta-analysis of previous fracture and subsequent fracture risk. *Bone* **35**, 375–382 (2004).
91. Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20945569>.
92. Riggs, B. L. & Melton, L. J. Osteoporosis and age-related fracture syndromes. *Ciba Found Symp* **134**, 129–42 (1988).

93. Cooper, C. & Melton, L. J. Epidemiology of osteoporosis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **3**, 224–229 (1992).
94. Kanis, J. A. *et al.* A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide. *Osteoporosis International* vol. 23 2239–2256 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00198-012-1964-3> (2012).
95. Azagra, R. *et al.* Changing trends in the epidemiology of hip fracture in Spain. *Osteoporosis International* **25**, 1267–1274 (2014).
96. Johnel, O., Gullberg, B., Allander, E. & Kanis, J. A. The apparent incidence of hip fracture in Europe: A study of national register sources. *Osteoporosis International* **2**, 298–302 (1992).
97. Cooper, C., Atkinson, E. J., Jacobsen, S. J., O’fallon, W. M. & Melton, L. J. Population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol* **137**, 1001–1005 (1993).
98. Melton, L. J. & Cooper, C. Magnitude and Impact of Osteoporosis and Fractures. in *Osteoporosis* 557–567 (Elsevier, 2001). doi:10.1016/B978-012470862-4/50022-2.
99. Painter, S. E., Kleerekoper, M. & Camacho, P. M. Secondary osteoporosis: A review of the recent evidence. *Endocrine Practice* vol. 12 436–445 Preprint at <https://doi.org/10.4158/EP.12.4.436> (2006).
100. Cerdá Gabaroi, D. *et al.* Search for hidden secondary causes in postmenopausal women with osteoporosis. *Menopause* **17**, 135–139 (2010).
101. Fitzpatrick, L. A. Secondary Causes of Osteoporosis. *Mayo Clin Proc* **77**, 453–468 (2002).
102. López-Delgado, L., Riancho-Zarrabeitia, L. & Riancho, J. A. Genetic and acquired factors influencing the effectiveness and toxicity of drug therapy in osteoporosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **12**, 389–398 (2016).
103. Naganathan, V. *et al.* Gender differences in the genetic factors responsible for variation in bone density and ultrasound. *Journal of Bone and Mineral Research* **17**, 725–733 (2002).
104. Bonjour, J. P., Chevalley, T., Ammann, P., Slosman, D. & Rizzoli, R. Gain in bone mineral mass in prepubertal girls 3.5 years after discontinuation of calcium supplementation: A follow-up study. *Lancet* **358**, 1208–1212 (2001).
105. Iolascon, G., Moretti, A., Cannaviello, G., Resmini, G. & Gimigliano, F. Proximal femur geometry assessed by hip structural analysis in hip fracture in women. *Aging Clin Exp Res* **27**, 17–21 (2015).
106. Leslie, W. D. *et al.* Hip axis length is a FRAX-and bone density-independent risk factor for hip fracture in women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **100**, 2063–2070 (2015).
107. Faulkner, K. G. *et al.* Simple measurement of femoral geometry predicts hip fracture: The study of osteoporotic fractures. *Journal of Bone and Mineral Research* **8**, 1211–1217 (1993).

108. Riancho, J. A. *et al.* Biomechanical indices of the femoral neck estimated from the standard DXA output: age- and sex-related differences. *J Clin Densitom* **10**, 39–45.
109. Hernandez, C. J. How can bone turnover modify bone strength independent of bone mass? *Bone* vol. 42 1014–1020 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.02.001> (2008).
110. Martineau, P. & Leslie, W. D. Trabecular bone score (TBS): Method and applications. *Bone* **104**, 66–72 (2017).
111. Güerri-Fernández, R. C. *et al.* Microindentation for in vivo measurement of bone tissue material properties in atypical femoral fracture patients and controls. *Journal of Bone and Mineral Research* **28**, 162–168 (2013).
112. Cummings, S. R. *et al.* Risk Factors for Hip Fracture in White Women. *New England Journal of Medicine* **332**, 767–774 (1995).
113. Howard, G. M., Nguyen, T. V., Harris, M., Kelly, P. J. & Eisman, J. A. Genetic and environmental contributions to the association between quantitative ultrasound and bone mineral density measurements: A twin study. *Journal of Bone and Mineral Research* **13**, 1318–1327 (1998).
114. Park, J. H. *et al.* Genetic influence on bone mineral density in Korean twins and families: The healthy twin study. *Osteoporosis International* **23**, 1343–1349 (2012).
115. Sosa, N. H. De *et al.* Heritability of bone mineral density in a multivariate family-based study. *Calcif Tissue Int* **94**, 590–596 (2014).
116. Ho, N. C. *et al.* A skeletal gene database. *Journal of Bone and Mineral Research* **15**, 2095–2122 (2000).
117. Gong, G. *et al.* The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms. *Osteoporosis International* **9**, 55–64 (1999).
118. Mann, V. *et al.* A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. *Journal of Clinical Investigation* **107**, 899–907 (2001).
119. Efstathiadou, Z., Tsatsoulis, A. & Ioannidis, J. P. A. Association of collagen I $\alpha$ 1 Sp1 polymorphism with the risk of prevalent fractures: A meta-analysis. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**, 1586–1592 (2001).
120. Ioannidis, J. P. A. *et al.* Association of Polymorphisms of the Estrogen Receptor  $\alpha$  Gene With Bone Mineral Density and Fracture Risk in Women: A Meta-Analysis. *Journal of Bone and Mineral Research* **17**, 2048–2060 (2002).
121. Richards, J. B. *et al.* Collaborative meta-analysis: Associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Ann Intern Med* **151**, 528–537 (2009).
122. Trajanoska, K. & Rivadeneira, F. The genetic architecture of osteoporosis and fracture risk. *Bone* vol. 126 2–10 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.04.005> (2019).
123. Riggs, B. L., Khosla, S. & Melton, L. J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrine Reviews* vol. 23 279–302 Preprint at <https://doi.org/10.1210/edrv.23.3.0465> (2002).

124. Khosla, S. & Riggs, B. L. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* vol. 34 1015–1030 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2005.07.009> (2005).
125. Eghbali-Fatourechi, G. *et al.* Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *Journal of Clinical Investigation* **111**, 1221–1230 (2003).
126. Hofbauer, L. C. *et al.* Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* **140**, 4367–4370 (1999).
127. Srivastava, S. *et al.* Estrogen Decreases Osteoclast Formation by Down-regulating Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL)-induced JNK Activation. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 8836–8840 (2001).
128. Qu, Q. *et al.* Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone* **22**, 201–209 (1998).
129. Mödder, U. *et al.* Regulation of circulating sclerostin levels by sex steroids in women and in men. *J Bone Miner Res* **26**, 27–34 (2011).
130. Pacifici, R. Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited. *Journal of Bone and Mineral Research* vol. 27 231–239 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jbmr.1500> (2012).
131. Masuzawa, T. *et al.* Estrogen deficiency stimulates B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Journal of Clinical Investigation* **94**, 1090–1097 (1994).
132. Li, J. Y. *et al.* Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *Journal of Clinical Investigation* **126**, 2049–2063 (2016).
133. Slemenda, C. W. *et al.* Sex steroids and bone mass in older men. Positive associations with serum estrogens and negative associations with androgens. *Journal of Clinical Investigation* **100**, 1755–1759 (1997).
134. Khosla, S., Melton, L. J. & Riggs, B. L. Estrogens and bone health in men. in *Calcified Tissue International* vol. 69 189–192 (2001).
135. *GUÍAS DE PRÁCTICA CLÍNICA EN LA OSTEOPOROSIS POSMENOPÁUSICA, GLUCOCORTICOIDEA Y DEL VARÓN. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN ÓSEA Y DEL METABOLISMO MINERAL (3ª versión actualizada 2014).* (2014).
136. Ozcivici, E. *et al.* Mechanical signals as anabolic agents in bone. *Nature Reviews Rheumatology* vol. 6 50–59 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.239> (2010).
137. Eastell, R. *et al.* Pharmacological management of osteoporosis in postmenopausal women: An endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 104 1595–1622 Preprint at <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00221> (2019).
138. Ross, A. C. *et al.* The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: What clinicians need to know. *Journal of Clinical*

- Endocrinology and Metabolism* vol. 96 53–58 Preprint at <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2704> (2011).
139. Gallagher, J. C. & Sai, A. J. Molecular biology of bone remodeling: Implications for new therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas* vol. 65 301–307 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2010.01.002> (2010).
  140. Khosla, S. Update on estrogens and the skeleton. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 3569–77 (2010).
  141. Hopkins, R. B. *et al.* The relative efficacy of nine osteoporosis medications for reducing the rate of fractures in post-menopausal women. *BMC Musculoskelet Disord* **12**, (2011).
  142. Murad, M. H. *et al.* Comparative effectiveness of drug treatments to prevent fragility fractures: A systematic review and network meta-analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97**, 1871–1880 (2012).
  143. Rogers, M. J., Crockett, J. C., Coxon, F. P. & Mönkkönen, J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* vol. 49 34–41 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.11.008> (2011).
  144. Russell, R. G. G., Watts, N. B., Ebetino, F. H. & Rogers, M. J. Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis International* vol. 19 733–759 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00198-007-0540-8> (2008).
  145. Bellido, T. & Plotkin, L. I. Novel actions of bisphosphonates in bone: Preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone* vol. 49 50–55 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.08.008> (2011).
  146. Cranney, A. *et al.* IX: Summary of meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. *Endocrine Reviews* vol. 23 570–578 Preprint at <https://doi.org/10.1210/er.2001-9002> (2002).
  147. Wells, G. A. *et al.* Risedronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2008) doi:10.1002/14651858.CD004523.pub3.
  148. Black, D. M. *et al.* Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *New England Journal of Medicine* **356**, 1809–1822 (2007).
  149. Pazianas, M. & Abrahamsen, B. Safety of bisphosphonates. *Bone* **49**, 103–110 (2011).
  150. Lyles, K. W. *et al.* Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *New England Journal of Medicine* **357**, 1799–1809 (2007).
  151. Bone, H. G. *et al.* 10 years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the phase 3 randomised FREEDOM trial and open-label extension. *Lancet Diabetes Endocrinol* **5**, 513–523 (2017).
  152. Bone, H. G. *et al.* Effects of denosumab treatment and discontinuation on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women with low bone mass. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **96**, 972–980 (2011).

153. Anastasilakis, A. D., Papapoulos, S. E., Polyzos, S. A., Appelman-Dijkstra, N. M. & Makras, P. Zoledronate for the Prevention of Bone Loss in Women Discontinuing Denosumab Treatment. A Prospective 2-year Clinical Trial. *Journal of Bone and Mineral Research* (2019) doi:10.1002/jbmr.3853.
154. Shane, E. *et al.* Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: Second report of a task force of the American society for bone and mineral research. *Journal of Bone and Mineral Research* vol. 29 1–23 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jbmr.1998> (2014).
155. Odvina, C. V, Levy, S., Rao, S., Zerwekh, J. E. & Rao, D. S. Unusual mid-shaft fractures during long-term bisphosphonate therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* **72**, 161–8 (2010).
156. Giusti, A. *et al.* Atypical fractures and bisphosphonate therapy: A cohort study of patients with femoral fracture with radiographic adjudication of fracture site and features. *Bone* **48**, 966–971 (2011).
157. Schilcher, J., Michaëlsson, K. & Aspenberg, P. Bisphosphonate use and atypical fractures of the femoral shaft. *N Engl J Med* **364**, 1728–37 (2011).
158. Thompson, R. N., Armstrong, C. L. & Heyburn, G. Bilateral atypical femoral fractures in a patient prescribed denosumab - A case report. *Bone* **61**, 44–47 (2014).
159. Delgado L & Ja, R. López. EDITORIAL / *Rev Osteoporos Metab Miner* **10**, 105–112 (2018).
160. Roca-Ayats, N. *et al.* Genetic study of atypical femoral fractures using exome sequencing in three affected sisters and three unrelated patients. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* **10**, 108–118 (2018).
161. Roca-Ayats, N. *et al.* Functional Characterization of a GGPPS Variant Identified in Atypical Femoral Fracture Patients and Delineation of the Role of GGPPS in Bone-Relevant Cell Types. *Journal of Bone and Mineral Research* **33**, 2091–2098 (2018).
162. Pérez-Núñez, I. *et al.* Exon array analysis reveals genetic heterogeneity in atypical femoral fractures. A pilot study. *Mol Cell Biochem* **409**, 45–50 (2015).
163. Nguyen, H. H. *et al.* Genetic Risk Factors for Atypical Femoral Fractures (AFFs): A Systematic Review. *JBMR Plus* **2**, 1–11 (2018).
164. Starr, J., Tay, Y. K. D. & Shane, E. Current Understanding of Epidemiology, Pathophysiology, and Management of Atypical Femur Fractures. *Current Osteoporosis Reports* vol. 16 519–529 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0464-6> (2018).
165. Reuther, T., Schuster, T., Mende, U. & Kübler, A. C. Osteoradionecrosis of the jaws as a side effect of radiotherapy of head and neck tumour patients - A report of a thirty year retrospective review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* vol. 32 289–295 Preprint at <https://doi.org/10.1054/ijom.2002.0332> (2003).
166. Ruggiero, S. L., Mehrotra, B., Rosenberg, T. J. & Engroff, S. L. Osteonecrosis of the Jaws Associated with the Use of Bisphosphonates: A Review of 63 Cases. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **62**, 527–534 (2004).

167. Khosla, S. *et al.* Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* **22**, 1479–91 (2007).
168. Khan, A., Morrison, A., Cheung, A., Hashem, W. & Compston, J. Osteonecrosis of the jaw (ONJ): diagnosis and management in 2015. *Osteoporosis International* vol. 27 853–859 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3335-3> (2016).
169. King, A. E. & Umland, E. M. Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous or oral bisphosphonates. *Pharmacotherapy* vol. 28 667–677 Preprint at <https://doi.org/10.1592/phco.28.5.667> (2008).
170. Rizzoli, R. *et al.* Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonate treatment for osteoporosis. *Bone* vol. 42 841–847 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.01.003> (2008).
171. Compston, J. Pathophysiology of atypical femoral fractures and osteonecrosis of the jaw. *Osteoporosis International* vol. 22 2951–2961 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00198-011-1804-x> (2011).
172. Papapoulos, S. *et al.* The effect of 8 or 5 years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the FREEDOM Extension study. *Osteoporos Int* **26**, 2773–83 (2015).
173. Sarasquete, M. E. *et al.* Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw is associated with polymorphisms of the cytochrome P450 CYP2C8 in multiple myeloma: A genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Blood* **112**, 2709–2712 (2008).
174. Marini, F. *et al.* Pharmacogenetics of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Frontiers in Bioscience - Elite* **3 E**, 364–370 (2011).
175. Jadu, F., Lee, L., Pharoah, M., Reece, D. & Wang, L. A retrospective study assessing the incidence, risk factors and comorbidities of pamidronate-related necrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Annals of Oncology* **18**, 2015–2019 (2007).
176. Wessel, J. H., Dodson, T. B. & Zavras, A. I. Zoledronate, Smoking, and Obesity Are Strong Risk Factors for Osteonecrosis of the Jaw: A Case-Control Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **66**, 625–631 (2008).
177. Sjølling, A. S. K., Harsløf, T. & Langdahl, B. Current Status of Bone-Forming Therapies for the Management of Osteoporosis. *Drugs and Aging* vol. 36 625–638 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s40266-019-00675-8> (2019).
178. Langdahl, B., Ferrari, S. & Dempster, D. W. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* vol. 8 225–235 Preprint at <https://doi.org/10.1177/1759720X16670154> (2016).
179. Tam, C. S., Heersche, J. N., Murray, T. M. & Parsons, J. A. Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology* **110**, 506–12 (1982).

180. Collinge, C. & Favela, J. Use of teriparatide in osteoporotic fracture patients. *Injury* **47**, S36–S38 (2016).
181. Neer, R. M. *et al.* Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* **344**, 1434–41 (2001).
182. Tella, S. H., Kommalapati, A. & Correa, R. Profile of Abaloparatide and Its Potential in the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *Cureus* (2017) doi:10.7759/cureus.1300.
183. Hattersley, G., Dean, T., Corbin, B. A., Bahar, H. & Gardella, T. J. Binding selectivity of abaloparatide for PTH-type-1-receptor conformations and effects on downstream signaling. *Endocrinology* **157**, 141–149 (2016).
184. Kaufman, J. M. *et al.* Teriparatide effects on vertebral fractures and bone mineral density in men with osteoporosis: treatment and discontinuation of therapy. *Osteoporos Int* **16**, 510–516 (2005).
185. Miller, P. D. *et al.* Effect of abaloparatide vs placebo on new vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis a randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **316**, 722–733 (2016).
186. Kendler, D. L. *et al.* Effects of teriparatide and risedronate on new fractures in postmenopausal women with severe osteoporosis (VERO): a multicentre, double-blind, double-dummy, randomised controlled trial. *Lancet* **391**, 230–240 (2018).
187. Vahle, J. L. *et al.* Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol Pathol* **30**, 312–321 (2002).
188. Jollette, J. *et al.* Comparing the incidence of bone tumors in rats chronically exposed to the selective PTH type 1 receptor agonist abaloparatide or PTH(1–34). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **86**, 356–365 (2017).
189. Vahle, J. L. *et al.* Bone Neoplasms in F344 Rats Given Teriparatide [rhPTH(1-34)] Are Dependent on Duration of Treatment and Dose. *Toxicol Pathol* **32**, 426–438 (2004).
190. Vahle, J. L. *et al.* Lack of bone neoplasms and persistence of bone efficacy in cynomolgus macaques after long-term treatment with teriparatide [rhPTH(1-34)]. *Journal of Bone and Mineral Research* **23**, 2033–2039 (2008).
191. Andrews, E. B. *et al.* The US postmarketing surveillance study of adult osteosarcoma and teriparatide: Study design and findings from the first 7 years. *Journal of Bone and Mineral Research* **27**, 2429–2437 (2012).
192. Padhi, D., Jang, G., Stouch, B., Fang, L. & Posvar, E. Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *Journal of Bone and Mineral Research* **26**, 19–26 (2011).
193. McClung, M. R. *et al.* Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* **370**, 412–20 (2014).

194. Genant, H. K. *et al.* Effects of Romosozumab Compared With Teriparatide on Bone Density and Mass at the Spine and Hip in Postmenopausal Women With Low Bone Mass. *J Bone Miner Res* **32**, 181–187 (2017).
195. Cosman, F. *et al.* Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, *et al.* Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med.* 2016; *New England Journal of Medicine* (2016) doi:10.1056/NEJMoa1607948.
196. Saag, K. G. *et al.* Romosozumab or alendronate for fracture prevention in women with osteoporosis. *New England Journal of Medicine* **377**, 1417–1427 (2017).
197. Lewiecki, E. M. *et al.* One Year of Romosozumab Followed by Two Years of Denosumab Maintains Fracture Risk Reductions: Results of the FRAME Extension Study. *Journal of Bone and Mineral Research* **34**, 419–428 (2019).
198. Lopez, A. D., Mathers, C. D., Ezzati, M., Jamison, D. T. & Murray, C. J. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* **367**, 1747–1757 (2006).
199. Altman, R. *et al.* The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* **34**, 505–14 (1991).
200. Altman, R. *et al.* The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum* **33**, 1601–1610 (1990).
201. Altman, R. *et al.* Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* **29**, 1039–1049 (1986).
202. Johnson, V. L. & Hunter, D. J. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **28**, 5–15 (2014).
203. Zhang, Y. *et al.* Prevalence of symptomatic hand osteoarthritis and its impact on functional status among the elderly: The framingham study. *Am J Epidemiol* **156**, 1021–1027 (2002).
204. Felson, D. T. *et al.* The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. the framingham osteoarthritis study. *Arthritis Rheum* **30**, 914–918 (1987).
205. Liu-Bryan, R. & Terkeltaub, R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* vol. 11 35–44 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.162> (2015).
206. Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis and Rheumatism* vol. 64 1697–1707 Preprint at <https://doi.org/10.1002/art.34453> (2012).
207. Waller, K. A. *et al.* Role of lubricin and boundary lubrication in the prevention of chondrocyte apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5852–5857 (2013).
208. Woodell-May, J. E. & Sommerfeld, S. D. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. *J Orthop Res* (2019) doi:10.1002/jor.24457.
209. Hawker, G. A. *et al.* Understanding the pain experience in hip and knee osteoarthritis - an OARSI/OMERACT initiative. *Osteoarthritis Cartilage* **16**, 415–422 (2008).

210. Hayashi, D., Roemer, F. W. & Guermazi, A. Imaging for osteoarthritis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* vol. 59 161–169 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2015.12.003> (2016).
211. O'Brien, W. M. Rheumatism in Populations. J. S. Lawrence. London, William Heinemann Medical Books, 1977. 572 Pages. *Arthritis Rheum* **21**, 398–398 (1978).
212. PROGNOSIS IN THE RHEUMATIC DISEASES. doi:10.1007/978-94-011-3896-3.
213. Yu, S. P. & Hunter, D. J. Managing osteoarthritis. *Aust Prescr* **38**, 115–119 (2015).
214. Lane, N. E. *et al.* Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee. *New England Journal of Medicine* **363**, 1521–1531 (2010).
215. Güler-Yüksel, M. *et al.* Treatment with TNF- $\alpha$  inhibitor infliximab might reduce hand osteoarthritis in patients with rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, 1256–62 (2010).
216. Verbruggen, G., Wittoek, R., Vander Cruyssen, B. & Elewaut, D. Tumour necrosis factor blockade for the treatment of erosive osteoarthritis of the interphalangeal finger joints: a double blind, randomised trial on structure modification. *Ann Rheum Dis* **71**, 891–8 (2012).
217. Magnano, M. D. *et al.* A pilot study of tumor necrosis factor inhibition in erosive/inflammatory osteoarthritis of the hands. *Journal of Rheumatology* **34**, 1323–1327 (2007).
218. Jaenisch, R. & Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**, 245–54 (2003).
219. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* vol. 128 693–705 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005> (2007).
220. Delgado-Calle, J. *et al.* Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **65**, 197–205 (2013).
221. del Real, A. *et al.* Differential analysis of genome-wide methylation and gene expression in mesenchymal stem cells of patients with fractures and osteoarthritis. *Epigenetics* **12**, 113–122 (2017).
222. Achour, C. & Aguilo, F. Long non-coding RNA and Polycomb: An intricate partnership in cancer biology. *Frontiers in Bioscience - Landmark* vol. 23 2106–2132 Preprint at <https://doi.org/10.2741/4693> (2018).
223. Hamam, D., Ali, D., Kassem, M., Aldahmash, A. & Alajez, N. M. Micronas as regulators of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **24**, 417–425 (2015).
224. Huang, J., Zhao, L., Xing, L. & Chen, D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells* **28**, 357–364 (2010).
225. Zhang, J. F. *et al.* MiR-637 maintains the balance between adipocytes and osteoblasts by directly targeting Osterix. *Mol Biol Cell* **22**, 3955–3961 (2011).

226. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* vol. 153 1194 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039> (2013).
227. Burtner, C. R. & Kennedy, B. K. Progeria syndromes and ageing: What is the connection? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 11 567–578 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm2944> (2010).
228. Armanios, M. *et al.* Short Telomeres are Sufficient to Cause the Degenerative Defects Associated with Aging. *Am J Hum Genet* **85**, 823–832 (2009).
229. Kanfi, Y. *et al.* The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature* **483**, 218–221 (2012).
230. Mostoslavsky, R. *et al.* Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* **124**, 315–329 (2006).
231. Rando, T. A. & Chang, H. Y. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: Resetting the aging clock. *Cell* vol. 148 46–57 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.003> (2012).
232. Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W. & Balch, W. E. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annual Review of Biochemistry* vol. 78 959–991 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.114844> (2009).
233. Koga, H., Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Research Reviews* vol. 10 205–215 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.02.001> (2011).
234. Barzilai, N., Huffman, D. M., Muzumdar, R. H. & Bartke, A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* vol. 61 1315–1322 Preprint at <https://doi.org/10.2337/db11-1300> (2012).
235. Fontana, L., Nehme, J. & Demaria, M. Caloric restriction and cellular senescence. *Mechanisms of Ageing and Development* vol. 176 19–23 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.10.005> (2018).
236. Flores, I. & Blasco, M. A. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Letters* vol. 584 3826–3830 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.042> (2010).
237. Rossi, D. J. *et al.* Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* **447**, 725–729 (2007).
238. Janzen, V. *et al.* Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 INK4a. *Nature* **443**, 421–426 (2006).
239. Tchkonina, T., Zhu, Y., Van Deursen, J., Campisi, J. & Kirkland, J. L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: Therapeutic opportunities. *Journal of Clinical Investigation* vol. 123 966–972 Preprint at <https://doi.org/10.1172/JCI64098> (2013).
240. Farr, J. N. *et al.* Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment. *Journal of Bone and Mineral Research* **31**, 1920–1929 (2016).

241. Kaur, J. & Farr, J. N. Cellular senescence in age-related disorders. *Translational Research* vol. 226 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.06.007> (2020).
242. Chandra, A. *et al.* Targeted Reduction of Senescent Cell Burden Alleviates Focal Radiotherapy-Related Bone Loss. *Journal of Bone and Mineral Research* **35**, 1119–1131 (2020).
243. Yao, Z. *et al.* Therapy-induced senescence drives bone loss. *Cancer Res* **80**, 1171–1182 (2020).
244. Coipeau, P. *et al.* Impaired differentiation potential of human trabecular bone mesenchymal stromal cells from elderly patients. *Cytotherapy* **11**, 584–594 (2009).
245. Yang, Y. H. K., Ogando, C. R., Wang See, C., Chang, T. Y. & Barabino, G. A. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther* **9**, 131 (2018).
246. Infante, A. & Rodríguez, C. I. Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy* vol. 9 244 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0995-x> (2018).
247. Neri, S. & Borzi, R. M. Molecular Mechanisms Contributing to Mesenchymal Stromal Cell Aging. *Biomolecules* **10**, 340 (2020).
248. Wu, M. *et al.* Cbf $\beta$  governs osteoblast–adipocyte lineage commitment through enhancing  $\beta$ -catenin signaling and suppressing adipogenesis gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 10119–10124 (2017).
249. Nishikawa, K. *et al.* Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 3455–3465 (2010).
250. Pasumarthy, K. K. *et al.* Methylome Analysis of Human Bone Marrow MSCs Reveals Extensive Age- and Culture-Induced Changes at Distal Regulatory Elements. *Stem Cell Reports* **9**, 999–1015 (2017).
251. Guo, Q., Chen, Y., Guo, L., Jiang, T. & Lin, Z. MIR-23a/b regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells. *Bone Res* **4**, 16022 (2016).
252. Ma, Y. *et al.* Autophagy controls mesenchymal stem cell properties and senescence during bone aging. *Aging Cell* **17**, e12709 (2018).
253. Moerman, E. J., Teng, K., Lipschitz, D. A. & Lecka-Czernik, B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: The role of PPAR- $\gamma$ 2 transcription factor and TGF- $\beta$ /BMP signaling pathways. *Aging Cell* **3**, 379–389 (2004).
254. Jilka, R. L. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* vol. 40 1434–1446 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.03.017> (2007).
255. D’Amelio, P. *et al.* Teriparatide increases the maturation of circulating osteoblast precursors. *Osteoporosis International* **23**, 1245–1253 (2012).

256. Kim, S. W. *et al.* Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research* **27**, 2075–2084 (2012).
257. Bernardo, M. E. *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* **67**, 9142–9149 (2007).
258. Heino, T. & Hentunen, T. Differentiation of Osteoblasts and Osteocytes from Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther* **3**, 131–145 (2008).
259. Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E. & Ringdén, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* **31**, 890–896 (2003).
260. Shyu, W. C., Lee, Y. J., Liu, D. D., Lin, S. Z. & Li, H. Homing genes, cell therapy and stroke. *Frontiers in Bioscience* vol. 11 899–907 Preprint at <https://doi.org/10.2741/1846> (2006).
261. Kitaori, T. *et al.* Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum* **60**, 813–23 (2009).
262. Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C. & Kassem, M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* **33**, 919–926 (2003).
263. Steinert, A. F., Rackwitz, L., Gilbert, F., Nöth, U. & Tuan, R. S. Concise Review: The Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells for Musculoskeletal Regeneration: Current Status and Perspectives. *Stem Cells Transl Med* **1**, 237–247 (2012).
264. Tolar, J. *et al.* Sarcoma Derived from Cultured Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* **25**, 371–379 (2007).
265. Lye, K. L., Nordin, N., Vidyadaran, S. & Thilakavathy, K. Mesenchymal stem cells: From stem cells to sarcomas. *Cell Biol Int* **40**, 610–8 (2016).
266. Tuan, R. S., Boland, G. & Tuli, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research and Therapy* vol. 5 32–45 Preprint at <https://doi.org/10.1186/ar614> (2003).
267. Bianco, P. & Robey, P. G. Stem cells in tissue engineering. *Nature* vol. 414 118–121 Preprint at <https://doi.org/10.1038/35102181> (2001).
268. Müller, P. *et al.* Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* **12**, 281–291 (2008).
269. Wittenburg, G., Flade, V., Garbe, A. I., Lauer, G. & Labudde, D. Scaffold preferences of mesenchymal stromal cells and adipose-derived stem cells from green fluorescent protein transgenic mice influence the tissue engineering of bone. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **52**, 409–414 (2014).
270. Sackstein, R. *et al.* Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med* **14**, 181–7 (2008).

271. LÓPEZ-LUCAS, M. D. *et al.* Production via good manufacturing practice of exofucosylated human mesenchymal stromal cells for clinical applications. *Cytotherapy* **20**, 1110–1123 (2018).
272. Ichioka, N. *et al.* Prevention of Senile Osteoporosis in SAMP6 Mice by Intrabone Marrow Injection of Allogeneic Bone Marrow Cells. *Stem Cells* **20**, 542–551 (2002).
273. Ocarino, N. D. M. *et al.* Intra-bone marrow injection of mesenchymal stem cells improves the femur bone mass of osteoporotic female rats. *Connect Tissue Res* **51**, 426–433 (2010).
274. Wang, Z. *et al.* Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. *Tissue Eng* **12**, 1753–1761 (2006).
275. Sui, B. *et al.* Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Therapy Promotes Osteoblastogenesis and Prevents Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Stem Cells Transl Med* **5**, 1238–1246 (2016).
276. Kiernan, J., Hu, S., Grynepas, M. D., Davies, J. E. & Stanford, W. L. Systemic Mesenchymal Stromal Cell Transplantation Prevents Functional Bone Loss in a Mouse Model of Age-Related Osteoporosis. *Stem Cells Transl Med* **5**, 683–693 (2016).
277. Mirsaidi, A. *et al.* Therapeutic potential of adipose-derived stromal cells in age-related osteoporosis. *Biomaterials* **35**, 7326–7335 (2014).
278. Ye, X. *et al.* Adipose-derived stem cells alleviate osteoporosis by enhancing osteogenesis and inhibiting adipogenesis in a rabbit model. *Cytotherapy* **16**, 1643–1655 (2014).
279. Wang, P. & Zhang, Z. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote healing of rabbit tibial fractures via JAK-STAT signaling pathway. *Exp Ther Med* **19**, 2310 (2020).
280. Liebergall, M. *et al.* Stem cell-based therapy for prevention of delayed fracture union: A randomized and prospective preliminary study. *Molecular Therapy* **21**, 1631–1638 (2013).
281. Fuss, I. J., Kanof, M. E., Smith, P. D. & Zola, H. Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord Blood. in *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc., 2009). doi:10.1002/0471142735.im0701s85.
282. Chen, L. & Ditzel, N. In vivo Heterotopic Bone Formation Assay Using Isolated Mouse and Human Mesenchymal Stem Cells. *Bio Protoc* **5**, (2015).
283. Abdallah, B. M., Ditzel, N. & Kassem, M. Assessment of bone formation capacity using in vivo transplantation assays: Procedure and tissue analysis. *Methods in Molecular Biology* **455**, 89–100 (2008).
284. Greiner, D. L., Hesselton, R. A. & Shultz, L. D. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* vol. 16 166–177 Preprint at <https://doi.org/10.1002/stem.160166> (1998).
285. Pérez-Campo, F. M. *et al.* Generation and characterization of two immortalized human osteoblastic cell lines useful for epigenetic studies. *J Bone Miner Metab* **35**, 150–160 (2017).

286. Del Real, A. *et al.* Differential analysis of genome-wide methylation and gene expression in mesenchymal stem cells of patients with fractures and osteoarthritis. *Epigenetics* **12**, 113–122 (2017).
287. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2009).
288. Alimbetov, D. *et al.* Suppression of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fibroblasts using small molecule inhibitors of p38 MAP kinase and MK2. *Biogerontology* **17**, 305–15 (2016).
289. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **5**, 99–118 (2010).
290. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M. & Narita, M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev* **28**, 99–114 (2014).
291. Park, S. *et al.* Osteonecrosis of the jaw developed in mice: Disease variants regulated by  $\gamma\delta$  T cells in oral mucosal barrier immunity. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 17349–17366 (2015).
292. Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H. D., Huizing, M. & Hoogstraten-Miller, S. Retro-orbital injections in mice. *Lab Animal* vol. 40 155–160 Preprint at <https://doi.org/10.1038/labon0511-155> (2011).
293. Katsara, O. *et al.* Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* **20**, 1549–1561 (2011).
294. Kjærgaard, K. *et al.* Bone Formation by Sheep Stem Cells in an Ectopic Mouse Model: Comparison of Adipose and Bone Marrow Derived Cells and Identification of Donor-Derived Bone by Antibody Staining. *Stem cells international* **2016**, 3846971 (2016).
295. Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O. & Michalek, J. Same or not the same? comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells and Development* vol. 21 2724–2752 Preprint at <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0722> (2012).
296. Chen, J. Y., Mou, X. Z., Du, X. C. & Xiang, C. Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **8**, 739–746 (2015).
297. Elahi, K. C. *et al.* Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem Cells International* vol. 2016 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2016/5646384> (2016).
298. Robey, P. G. Cell Sources for Bone Regeneration: The Good, the Bad, and the Ugly (But Promising). **17**, (2011).
299. Obermeyer, T. S. *et al.* Mesenchymal stem cells facilitate fracture repair in an alcohol-induced impaired healing model. *Journal of Orthopaedic Trauma* **26**, 712–718 (2012).

300. Benisch, P. *et al.* The Transcriptional Profile of Mesenchymal Stem Cell Populations in Primary Osteoporosis Is Distinct and Shows Overexpression of Osteogenic Inhibitors. *PLoS ONE* **7**, (2012).
301. Rodríguez, J. P., Garat, S., Gajardo, H., Pino, A. M. & Seitz, G. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. *Journal of Cellular Biochemistry* **75**, 414–423 (1999).
302. Stenderup, K., Justesen, J., Eriksen, E. F., Rattan, S. I. S. & Kassem, M. Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**, 1120–1129 (2001).
303. Scott, M. A. *et al.* Brief review of models of ectopic bone formation. *Stem Cells and Development* vol. 21 655–667 Preprint at <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0517> (2012).
304. Z, Y. *et al.* Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials* **17**, 2131–2137 (1996).
305. P, H. & K, de G. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **1**, 25–32 (2007).
306. Mankani, M. H., Kuznetsov, S. A., Fowler, B., Kingman, A. & Robey, P. G. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: Effect of carrier particle size and shape. *Biotechnology and Bioengineering* **72**, 96–107 (2001).
307. Im, G. II & Kim, M. K. The relationship between osteoarthritis and osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* vol. 32 101–109 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00774-013-0531-0> (2014).
308. Geusens, P. P. & Van Den Bergh, J. P. Osteoporosis and osteoarthritis: Shared mechanisms and epidemiology. *Current Opinion in Rheumatology* vol. 28 97–103 Preprint at <https://doi.org/10.1097/BOR.000000000000256> (2016).
309. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* vol. 153 1194 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039> (2013).
310. Infante, A. & Rodríguez, C. I. Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy* **9**, 244 (2018).
311. Roforth, M. M. *et al.* Global transcriptional profiling using RNA sequencing and DNA methylation patterns in highly enriched mesenchymal cells from young versus elderly women. *Bone* **76**, 49–57 (2015).
312. Beane, O. S., Fonseca, V. C., Cooper, L. L., Koren, G. & Darling, E. M. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS ONE* **9**, (2014).
313. Farr, J. N. *et al.* Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment. *Journal of Bone and Mineral Research* **31**, 1920–1929 (2016).

314. Khosla, S., Farr, J. N. & Kirkland, J. L. Inhibiting Cellular Senescence: A New Therapeutic Paradigm for Age-Related Osteoporosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **103**, 1282–1290 (2018).
315. Pignolo, R. J., Passos, J. F., Khosla, S., Tchkonja, T. & Kirkland, J. L. Reducing Senescent Cell Burden in Aging and Disease. *Trends in Molecular Medicine* vol. 26 630–638 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.03.005> (2020).
316. Khosla, S., Farr, J. N., Tchkonja, T. & Kirkland, J. L. The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease. *Nature Reviews Endocrinology* vol. 16 263–275 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0335-y> (2020).
317. Kim, S. *et al.* IL-36 Induces Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw-Like Lesions in Mice by Inhibiting TGF- $\beta$ -Mediated Collagen Expression. *Journal of Bone and Mineral Research* **32**, 309–318 (2017).
318. Kikuri, T. *et al.* Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Journal of Bone and Mineral Research* **25**, 1668–1679 (2010).
319. Y, L. *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell therapy for bisphosphonate-related jaw osteonecrosis in Swine. *Stem cells and development* **22**, 2047–2056 (2013).
320. Zhao, Y. *et al.* Technetium-99 conjugated with methylene diphosphonate ameliorates ovariectomy-induced osteoporotic phenotype without causing osteonecrosis in the jaw. *Calcified Tissue International* **91**, 400–408 (2012).
321. Falster, C. *et al.* Mesenchymal stem cells isolated from both distal femurs of patients with unilateral trauma or osteoarthritis of the knee exhibit similar in-vitro ability of bone formation. *Journal of Orthopaedic Science* **24**, 918–924 (2019).
322. Campbell, T. M. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Alterations in Bone Marrow Lesions in Patients With Hip Osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology* **68**, 1648–1659 (2016).
323. Choi, Y. J. *et al.* Transcriptional profiling of human femoral mesenchymal stem cells in osteoporosis and its association with adipogenesis. *Gene* **632**, 7–15 (2017).
324. Tornero-Esteban, P. *et al.* Altered expression of wnt signaling pathway components in osteogenesis of mesenchymal stem cells in osteoarthritis patients. *PLoS ONE* **10**, (2015).
325. Jin, W. J., Jiang, S. D., Jiang, L. S. & Dai, L. Y. Differential responsiveness to 17 $\beta$ -estradiol of mesenchymal stem cells from postmenopausal women between osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporosis International* **23**, 2469–2478 (2012).
326. Rollín, R. *et al.* Differential proteome of bone marrow mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients. *Osteoarthritis and Cartilage* **16**, 929–935 (2008).
327. Weinans, H. *et al.* Pathophysiology of peri-articular bone changes in osteoarthritis. *Bone* vol. 51 190–196 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.02.002> (2012).
328. Burr, D. B. The Importance of Subchondral Bone in the Progression of Osteoarthritis. in *Journal of Rheumatology* vol. 31 77–80 (J Rheumatol Suppl, 2004).

329. Gruber, R., Stadlinger, B. & Terheyden, H. Cell-to-cell communication in guided bone regeneration: molecular and cellular mechanisms. *Clinical Oral Implants Research* vol. 28 1139–1146 Preprint at <https://doi.org/10.1111/clr.12929> (2017).
330. Saran, U., Gemini Piperni, S. & Chatterjee, S. Role of angiogenesis in bone repair. *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 561 109–117 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.006> (2014).
331. Bork, S. *et al.* DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell* **9**, 54–63 (2010).
332. Li, Z. *et al.* Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation. *PLoS ONE* **6**, (2011).
333. Ganguly, P. *et al.* Age-related Changes in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: A Potential Impact on Osteoporosis and Osteoarthritis Development. *Cell Transplantation* vol. 26 1520–1529 Preprint at <https://doi.org/10.1177/0963689717721201> (2017).
334. Antebi, B., Pelled, G. & Gazit, D. Stem cell therapy for osteoporosis. *Current Osteoporosis Reports* vol. 12 41–47 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11914-013-0184-x> (2014).